

Dissertation

Victor A. Augustin

2016

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)**

**VASKULARISIERUNG VON PORÖSEM POLYETHYLEN (MEDPOR®) UNTER
EINFLUSS VON MACROPHAGE-ACTIVATING LIPOPEPTIDE-2 (MALP-2) UND
SAUERSTOFFPLASMABEHANDLUNG**

Eine experimentelle *in vivo* Studie am Rückenhautkammermodell der Maus

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

2016

vorgelegt von Victor A. Augustin
geboren am 08.07.1989 in Würzburg

Datum:

Dekan:

Berichterstatter:

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. ZUSAMMENFASSUNG..... | 1 |
| 2. SUMMARY | 3 |
| 3. EINLEITUNG | 5 |
| 4. ZIEL DER STUDIE | 11 |
| 5. MATERIAL UND METHODEN..... | 12 |
| 5.1. Versuchstiere | 12 |
| 5.2. Experimentelles Modell | 12 |
| 5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer | 12 |
| 5.2.2. Präparation der Rückenhautkammer | 14 |
| 5.2.3. Applikation von MALP-2 | 17 |
| 5.2.4. Medpor® | 18 |
| 5.2.5. Plasmabehandlung von Medpor® | 18 |
| 5.2.6. Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 19 |
| 5.2.7. Implantation von Medpor® | 21 |
| 5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie | 22 |
| 5.3.1. Mikrozirkulatorische Analysen | 23 |
| 5.3.1.1. <i>Leukozyten-Endothelzell-Interaktion</i> | 24 |
| 5.3.1.2. <i>Gefäßdurchmesser</i> | 24 |
| 5.3.1.3. <i>Blutzellgeschwindigkeit</i> | 25 |
| 5.3.1.4. <i>Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss</i> | 25 |
| 5.3.1.5. <i>Scherrate</i> | 26 |
| 5.3.1.6. <i>Angiogenese-positive ROIs</i> | 26 |
| 5.3.1.7. <i>Funktionelle Kapillardichte</i> | 26 |
| 5.4. Experimentelles Protokoll..... | 27 |
| 5.4.1. Versuchsablauf Studienabschnitt 1..... | 27 |
| 5.4.1.1. <i>Untersuchungsgruppen</i> | 28 |
| 5.4.2. Versuchsablauf Studienabschnitt 2..... | 28 |
| 5.4.2.1. <i>Untersuchungsgruppen</i> | 29 |

| | |
|--|---------------|
| 5.4.3. Analyseprotokoll | 29 |
| 5.5. Histologie und Immunhistochemie | 30 |
| 5.5.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung | 30 |
| 5.5.2. Sirius Red-Färbung | 31 |
| 5.5.3. CD31-Färbung | 31 |
| 5.5.4. F4/80-Färbung | 32 |
| 5.5.5. Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS)- und Arginase (Arg)-1-Färbung | 32 |
| 5.6. Statistik | 33 |
| 6. ERGEBNISSE | 34 |
| 6.1. Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer | 34 |
| 6.2. Vaskularisierung von Medpor® nach MALP-2 Applikation | 35 |
| 6.2.1. Vaskularisierung von implantiertem Medpor® | 35 |
| 6.2.1.1. Angiogenese-positive ROIs | 36 |
| 6.2.1.2. Funktionelle Kapillardichte | 38 |
| 6.2.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion | 39 |
| 6.2.3. Histologie und Immunhistochemie | 41 |
| 6.2.4. Wirkung von MALP-2 in biomaterialfreiem Gewebe | 43 |
| 6.3. Vaskularisierung von Medpor® nach Plasmabehandlung | 45 |
| 6.3.1. Oberflächencharakterisierung von Medpor® | 45 |
| 6.3.2. Vaskularisierung von implantiertem Medpor® | 46 |
| 6.3.2.1. Angiogenese-positive ROIs | 47 |
| 6.3.2.2. Funktionelle Kapillardichte | 48 |
| 6.3.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion | 49 |
| 6.3.4. Histologie und Immunhistochemie | 51 |
| 6.3.5. Zelladhäsion auf Medpor® | 53 |
| 6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse | 55 |
| 7. DISKUSSION | 57 |
| 7.1. Diskussion von Material und Methodik | 57 |
| 7.1.1. Diskussion des Modells | 57 |
| 7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken | 59 |
| 7.2. Diskussion der Ergebnisse | 60 |
| 7.2.1. Vaskularisierung von Medpor® nach MALP-2 Applikation | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.1.1. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven | 64 |
| 7.2.2. Vaskularisierung von Medpor® nach Plasmabehandlung | 64 |
| 7.2.2.1. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven | 67 |
| 8. LITERATUR | 68 |
| 9. DANKSAGUNG | 81 |
| 10. PUBLIKATIONEN | 82 |

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der rekonstruktiven Chirurgie ist häufig eine Defektdeckung mit körpereigenem Gewebe nicht möglich. In diesem Fall müssen verschiedene Biomaterialien als Ersatz verwendet werden. Diese sollten optimal vaskularisieren und so in das umliegende Gewebe inkorporiert werden, um Infektionen vorzubeugen. Umgekehrt kann auch die Hemmung der Vaskularisierung von Biomaterialien im klinischen Alltag nützlich sein. So ist zum Beispiel eine Vaskularisierung und Inkorporation von Kathetersystemen oder chirurgischen Drainagen, die nur kurzzeitig im Patienten verbleiben, von Nachteil. Für den klinischen Erfolg ist es deshalb besonders wichtig, je nach Bedarf die Vaskularisierung von implantierten Biomaterialien zu stimulieren oder zu inhibieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ansätze zur Beeinflussung der Vaskularisierung von porösem Polyethylen (Medpor®) untersucht. Medpor® ist ein nicht resorbierbares, poröses Polyethylen, das häufig in der kraniofazialen Chirurgie zur Rekonstruktion von Defekten implantiert wird. Im ersten Studienabschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob eine lokale Applikation von macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2), ein Toll-like Rezeptor-Agonist mit pro-angiogenen Eigenschaften, das Einwachsen neuer Blutgefäße in Medpor® und damit die Inkorporation des Materials in das Gewebe verbessert. Das Biomaterial wurde hierzu in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen implantiert, in die verschiedene Dosen von MALP-2 oder Vehikel als Kontrolle appliziert wurden. Über einen Untersuchungszeitraum von 14 Tagen wurden anschließend mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, Histologie und Immunhistochemie die Vaskularisierung und die entzündliche Reaktion des Empfängergewebes untersucht. Dabei verbesserte MALP-2 dosisabhängig die Vaskularisierung von Medpor®. Gleichzeitig konnte in den ersten drei Tagen nach Implantation eine temporäre Entzündungsreaktion im Empfängergewebe nachgewiesen werden. Nach dem 14-tägigen Untersuchungszeitraum wiesen die Implantate in den MALP-2-behandelten Kammern im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich höhere Gefäß- und Makrophagendichte auf. Demgegenüber war in Kammern, in die kein Medpor® implantiert wurde, keine angiogene Reaktion nach MALP-2 Behandlung nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Applikation von MALP-2 einen vielversprechenden Ansatz darstellt,

um die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® zu verbessern, ohne lokale oder systemische Nebenwirkungen zu induzieren.

Im zweiten Studienabschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob auch eine reine Materialmodifikation mittels Sauerstoffplasmabehandlung die Vaskularisierung von Medpor® verbessern kann. Dazu wurden Medpor®-Proben vor Untersuchungsbeginn in einer Plasmakammer mit niedrigem und hohem Energie Level vorbehandelt. Anschließend wurden die Proben und unbehandelte Kontrollen in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen zur Analyse der Vaskularisierung, Entzündungsreaktion und Granulationsgewebe implantiert. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Plasma-behandelten Proben zeigten eine zunehmende Rauigkeit und einen erhöhten Sauerstoffgehalt der Oberfläche bei steigendem Energie Level. Die makroskopische Struktur des Materials veränderte sich dabei jedoch nicht. Nach Implantation in die Rückenhautkammer zeigte sich keinerlei Entzündungsreaktion im Empfängergewebe aller Untersuchungsgruppen. Interessanterweise wiesen die Plasma-behandelten Medpor®-Proben eine verschlechterte Vaskularisierung auf. In zusätzlichen *in vitro* Experimenten konnte eine stark reduzierte Zelladhäsion auf Plasma-behandeltem Medpor® nachgewiesen werden. Somit kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass eine Plasmabehandlung zur Verbesserung der Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® nicht empfohlen werden kann. Allerdings könnte diese Materialmodifikation bei temporär implantierten Polyethylen-basierten Materialien, wie Kathetersystemen oder chirurgischen Drainagen, sinnvoll sein, da bei diesen eine Gewebeeinkorporation ungünstig ist.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, dass sowohl die topische Applikation von MALP-2 als auch die Oberflächenmodifikation durch Plasmabehandlung die Vaskularisierung von Medpor® stark beeinflussen. Je nach Anwendungsgebiet können diese Ansätze zukünftig dazu beitragen, den klinischen Erfolg therapeutischer Maßnahmen, die mit einer Implantation von Polyethylen einhergehen, zu verbessern.

2. SUMMARY

In reconstructive surgery, the coverage of tissue defects is often not possible with autologous tissue. In this case, implanted biomaterials may serve as tissue substitutes. To reduce the risk of infections these biomaterials should well vascularize and incorporate into the surrounding tissue. On the other hand, the inhibition of their vascularization may also be beneficial for certain clinical applications. For instance, vascularization and tissue incorporation of catheter systems or surgical drainages, which are only temporarily implanted, is not desired. Hence, stimulation or inhibition of biomaterial vascularization is of major importance dependent on the clinical application.

In the present thesis, two vascularization approaches for Medpor® have been analyzed. Medpor® is a non-resorbable, porous polyethylen, which is often used in craniofacial surgery for defect reconstruction. Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) is a toll-like receptor agonist with pro-angiogenic properties. In the first part of this thesis, it was analyzed whether the local application of MALP-2 improves the ingrowth of new blood vessels into Medpor® and, thus, improves the incorporation of the biomaterial into the surrounding tissue. For this purpose, the biomaterial was implanted into dorsal skinfold chambers of BALB/c mice, which were topically exposed to different MALP-2 doses or vehicle as control. Subsequently, the angiogenic and inflammatory host tissue response to the implants was analyzed by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry throughout an observation period of 14 days. MALP-2 dose-dependently improved the vascularization of Medpor®. This was associated with a temporary inflammatory reaction in the host tissue during the first 3 days after implantation. After 14 days, the implants in MALP-2-treated chambers showed a significantly higher density of both, blood vessels and macrophages. Biomaterial-free chambers did not show any signs of angiogenesis after MALP-2 treatment. These results demonstrate that the application of MALP-2 effectively stimulates the early vascularization and incorporation of Medpor® without inducing any local or systemic side effects.

In the second part of the present thesis it was analyzed, whether plasma etching improves the early angiogenic host tissue response to Medpor®. Medpor® samples were pretreated in a plasma chamber at low and high energy levels. The

treated samples and non-treated controls were implanted into dorsal skinfold chambers of BALB/c mice for the analysis of vascularization, inflammation and granulation tissue formation. Scanning electron microscopic analyses of the plasma-treated samples revealed that elevating energy levels progressively increase the surface roughness and oxygen content of Medpor® when compared to the non-treated controls. However, the macroporous structure of Medpor® was not affected by plasma treatment. After implantation into the dorsal skinfold chamber there was no inflammatory reaction of the host tissue to the samples of the different groups. However, plasma-treated samples exhibited an impaired vascularization. Additional *in vitro* experiments showed a markedly reduced cell attachment on plasma-etched Medpor®. These results demonstrate that plasma etching may not be recommended to improve the vascularization and incorporation of Medpor®. On the other hand, surface modification by plasma etching may be beneficial for temporarily implanted polyethylene-based biomedical devices, such as catheters or surgical drainages, for which a tissue incorporation is not desired.

Taken together, the results of the present thesis demonstrate that topical application of MALP-2 and plasma etching significantly influence the vascularization of Medpor®. Hence, these approaches may be suitable to improve the clinical success of future therapeutic interventions, which are associated with the implantation of polyethylene.

3. EINLEITUNG

Im Rahmen der rekonstruktiven Chirurgie kommt es häufig zu ausgedehnten Gewebedefekten, die oft nicht oder nur eingeschränkt durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden können. Hierbei kann es notwendig werden, die Gewebedefekte mit künstlichen Materialien zu decken. Solche Implantate befinden sich bereits seit Jahrzehnten in klinischer Anwendung [BERGHAUS, 1985]. Die Auswahl des Biomaterials nach Struktur, Formstabilität, Plastizität und Resistenz gegenüber Infektionen ist dabei von entscheidender Bedeutung, um eine adäquate Biokompatibilität und damit akzeptable Langzeitfunktion zu gewährleisten [BERGHAUS et al., 2006].

Im Bereich der Materialwissenschaften werden kontinuierlich neue Biomaterialien für verschiedene Anwendungsbereiche entwickelt und optimiert. So werden inzwischen Implantatsysteme zur Pharmakotherapie [SVIRSKIS et al., 2010], Metallimplantate [RYAN et al., 2006], Gefäßprothesen [ROLL et al., 2008], Knochen- und Knorpelersatzmaterial [BUSENLECHNER et al., 2008; BERGHAUS et al., 2010] sowie zahlreiche synthetische chirurgische Netze [SHANKARAN et al., 2011] für die klinische Anwendung angeboten. All diese Materialien sollten keine lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen hervorrufen. Weiterhin sollten sie nach Implantation möglichst schnell vaskularisieren und auf diese Weise gut in das umliegende Empfängergerewebe inkorporieren, um das Infektionsrisiko zu minimieren.

Es wurde auch gezeigt, dass die Komplikationen einer Biomaterialimplantation entscheidend von der Lokalisation abhängig sind. So treten im Rahmen von Orbitarekonstruktionen weniger Komplikationen als bei Rhinoplastiken auf [JUNG et al., 2012; STELTER et al., 2007; WINKLER et al., 2012]. Dies erklärt sich dadurch, dass im Bereich der Nase nur wenig vaskularisiertes Gewebe zur Deckung der Implantate vorhanden ist.

Medpor® ist ein nicht resorbierbares, poröses Polyethylen, das im Bereich der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie zur Rekonstruktion von kraniofazialen Defekten bereits klinisch eingesetzt wird [YAREMCHUK, 2003; MOHAMMADI et al., 2012; NIECHAJEV, 2012]. Es wird sowohl für den

Knorpelersatz, beispielsweise im Rahmen der Ohrmuschelrekonstruktion [REINISCH und LEWIN 2009], als auch zum Knochenersatz verwendet (*Abbildung 1*).



Abbildung 1: Aufnahmen von Medpor® als planes, poröses Plättchen (A), zur Rekonstruktion der Schädeldecke [www.elektronmedikal.com.tr] (B) und als Knorpelersatz für Ohrprothesen [www.microtiaear surgery.com/medpor-faq] (C).

Da Medpor® nicht resorbierbar ist, wird eine dauerhafte Strukturstabilität gewährleistet. Im Gegensatz zu autologen Implantaten ist Medpor® jederzeit verfügbar. Zudem wird es in verschiedenen Größen und Formen angeboten und kann durch seine gute Formbarkeit je nach klinischer Situation optimal angepasst werden [NAUMANN et al. 2011].

Experimentelle Studien zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen der Geschwindigkeit des Einwachsens von Medpor® und der Infektionsrate besteht. So ist Medpor® empfänglicher für Infektionen, wenn es in Kontakt mit Bakterien kommt, bevor die Poren mit vaskularisiertem Granulationsgewebe gefüllt sind [SCLAFANI et al., 1997]. Weiterhin können durch eine frühe Vaskularisierung und Inkorporation (*Abbildung 2*) das Wandern des Materials im Gewebe sowie dessen Freilegung vermindert werden [NAIK et al., 2007; STRIETH et al., 2013].

In Langzeitstudien wurden bereits geringe Komplikationsraten bei Medpor®-Implantation berichtet [VENDEMIJA et al., 2011; CHO et al., 2013]. Dennoch ist davon auszugehen, dass die vorliegenden klinischen Ergebnisse durch eine beschleunigte Vaskularisierung und Inkorporation des Materials noch weiter verbessert werden können.

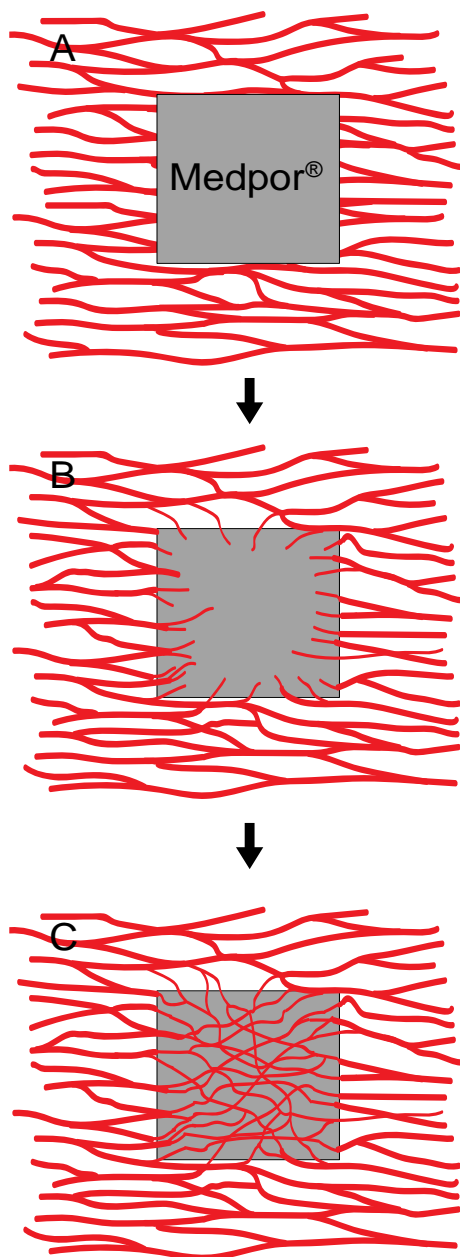


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor®. A: Das Biomaterial ist implantiert, allerdings noch nicht vaskularisiert. B: Das Gewebe reagiert auf das Fremdmaterial mit der Ausbildung von Gefäßsprossen. C: Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerkes im Bereich des gut inkorporierten Biomaterials.

In bisherigen Studien wurden bereits die Auswirkungen einer Corticosteroid-Therapie auf die Implantation von Medpor® untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sinnvoll ist, auf eine perioperative prophylaktische Corticosteroid-Therapie zur Ödemprophylaxe bei Medpor®-Implantation zu verzichten. So verschlechterte die Corticosteroid-Therapie die Vaskularisierung der Implantate [EHRMANTRAUT et al., 2010; NAUMANN et al., 2011].

Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die Vaskularisierung von Medpor® durch Modifizierung der Oberfläche verbessert werden kann. Hierzu wurde die Oberfläche des Biomaterials mit extrazellulärer Matrix und vascular endothelial growth factor (VEGF) beschichtet [STRIETH et al., 2010].

Weiterhin wurden isolierte humane Chondrozyten verwendet, um die frühe Vaskularisierung von Medpor® zu verbessern [EHRMANTRAUT et al., 2012]. Die Chondrozyten wurden auf die Biomaterialoberfläche gesiedelt und die Implantate anschließend im Modell der Rückenhautkammer untersucht. Hierbei zeigte sich neben einer verbesserten Vaskularisierung, dass die Chondrozyten eine bioprotektive Gewebeschicht ausbilden, welche die Akkumulation von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen verhindern.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmalig untersucht, ob durch topische Gabe von macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) die Vaskularisierung von Medpor® verbessert werden kann. MALP-2 ist ein

Toll-like Rezeptor-2/6 Agonist, der ursprünglich in Mykoplasmen entdeckt und daraus isoliert wurde [MÜHLRADT et al., 1997]. Die Entdeckung von Toll-like Rezeptoren (TLRs) erfolgte Mitte der neunziger Jahre eher zufällig im Rahmen der Untersuchung von Toll-negativen Mutanten, die anfälliger gegen Pilzkrankheiten sind [LEMAITRE et al., 1996]. Seitdem wurden mehrere TLRs identifiziert, sodass es heute eine Protein-Familie mit mehr als 10 verschiedenen TLRs gibt, die in Menschen und auch Mäusen zu finden sind [TAKEDA et al., 2001]. TLRs sind vor allem als Erkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems bekannt [GROTE et al., 2010]. Diese sind für die Immunabwehr verantwortlich, da sie die pathogen associated molecular patterns (PAMPs) von Antigenen erkennen. So kann die Aktivierung des antigen-spezifischen erworbenen Immunsystems eingeleitet werden. MALP-2 kann synthetisch hergestellt werden. Da MALP-2 ein potenter Stimulator des Immunsystems ist, wurde es ursprünglich als mukosaler Zusatz für Impfungen eingesetzt [RHARBAOUI et al., 2002; LÜHRMANN et al., 2005]. Außerdem wird es zur Induktion der Toleranz von Lipopolysacchariden verwendet [DEITERS et al., 2003]. GROTE et al. [2010] zeigten, dass MALP-2 die Angiogenese über den TLR-2/6 Signalweg stimuliert. Weiterhin fördert MALP-2 die Reendothelialisierung von geschädigten Gefäßen und reduziert die Entstehung von Narbengewebe [GROTE et al., 2013b]. Diese regenerativen Effekte von MALP-2 beruhen auf einer autokrinen und parakrinen Stimulation der Angiogenese [GROTE et al., 2010; GROTE et al., 2013a]. Durch Applikation von MALP-2 kommt es zu einer temporären Reaktion von Zellen des Immunsystems, wie Monozyten und Makrophagen, für einen Zeitraum von etwa 48 Stunden [NIEBUHR et al., 2008; GROTE et al. 2010]. Weiterhin hat MALP-2 tumorsuppressive Effekte auf Bauchspeicheldrüsentumore, was vermutlich auf Grund einer verstärkten Aktivierung inflammatorischer Zellen im Tumor geschieht und so zu einer Zerstörung des Tumorgewebes führt [SCHNEIDER et al., 2004; SCHMIDT et al., 2007]. In verschiedenen Studien wurden neben tumorsuppressiven auch regenerative Effekte von MALP-2 beschrieben. So bewirkt die intrakutane Injektion von MALP-2 eine Beschleunigung der Wundheilung bei Mäusen mit Diabetes [DEITERS et al., 2004]. Zudem wurde MALP-2 bereits erfolgreich dazu angewandt, die humane Wundheilung nach oberflächlichen Hautulcerationen zu steigern [NIEBUHR et al., 2008]. So wurden 12 Patienten über eine Woche untersucht, nachdem MALP-2 in 2mm große artifizielle Wunden appliziert worden war. Neben einer lokalen Entzündungsreaktion über zwei Tage waren sowohl bei gesunden Patienten als auch bei Diabetikern keine

systemischen Nebenwirkungen festzustellen. Dabei führte MALP-2 zu einer deutlich beschleunigten Wundheilung.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Vaskularisierung von Medpor® durch eine Oberflächenmodifikation verbessert werden kann. Eine reine Modifikation der Oberfläche von Medpor® könnte im Gegensatz zu aufwendigen Tissue Engineering-Ansätzen von Vorteil sein, da ein solcher Ansatz aufgrund geringerer regulatorischer Hürden leichter im klinischen Alltag etabliert werden kann.

Für die Modifikation wurde das Biomaterial einer Sauerstoffplasmabehandlung unterzogen. Als Plasma bezeichnet man ein gasförmiges Gemisch, das aus elektrisch geladenen Ionen und elektrisch neutralen Atomen bzw. Molekülen besteht. Bei der Sauerstoffplasmabehandlung wird dem Implantat in einer Vakuumkammer reiner Sauerstoff zugeführt. Durch das Zuführen von Energie wird der Sauerstoff leitend, was zum Lösen von Elektronen führt, wodurch Plasma entsteht. Diese Technologie wird zunehmend genutzt, um die Oberflächeneigenschaften von verschiedenen Biomaterialien zu modifizieren.

Die Auswirkungen der Plasmabehandlung beruhen auf der Verwendung von Gasen und Energie. Somit können Biomaterialien, je nach verwendetem Gas und Energie Level, unterschiedlich modifiziert werden. Es kann damit sowohl die Oberflächenstruktur als auch die Oberflächenchemie des Materials verändert werden. Beispielsweise unterstützt die Plasmabehandlung mit Sauerstoff und Argon die Inkorporation von sauerstoffhaltigen Gruppen in das Biomaterial. Die Integration von stickstoffhaltigen Gruppen wird hingegen durch die Behandlung mit Stickstoff und Ammoniak gefördert [RHODES et al., 2007]. Erhöhung der Energie Level bei der Plasmabehandlung erhöht die Oberflächenrauigkeit des eingesetzten Materials. Interessanterweise konnten Materialmodifikationen durch Plasmabehandlung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die zelluläre Reaktion auf verschiedene Biomaterialien verbessern [ENDRES et al., 2008]. RING et al. [2011] untersuchten die Vaskularisierung von allogenem Knochenersatzmaterial (humane Femurköpfe) nach Behandlung in einer Gas-Plasmakammer. Hierzu wurde das plasmabehandelte Knochenersatzmaterial in die Rückenhautkammer von 10 Mäusen implantiert und über 10 Tage beobachtet. Auf diese Weise konnte eine verbesserte Vaskularisierung der Implantate nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun erstmals untersucht werden, ob vergleichbare positive Effekte bei einer Plasmabehandlung von Medpor® erzielt werden können.

Um die Auswirkungen einer lokalen MALP-2-Applikation bzw. einer Plasmabehandlung von Medpor® analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit das Modell der Rückenhautkammer eingesetzt. Dieses Modell erlaubt es mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, die inflammatorische und angiogene Reaktion des Empfängerorgans auf implantierte Medpor®-Proben repetitiv über einen Zeitraum von 14 Tagen *in vivo* zu untersuchen.

4. ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor®-Implantaten zu verbessern. Im ersten Studienabschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob dies durch die lokale Applikation von MALP-2 erzielt werden kann. Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Induziert MALP-2 eine lokale Entzündungsreaktion?
2. Verbessert MALP-2 die Vaskularisierung von Medpor®?
3. Welche Wirkung hat MALP-2 auf implantatfreies Gewebe?

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde analysiert, ob die Vaskularisierung von Medpor® durch Sauerstoffplasmabehandlung verbessert werden kann. Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Wie verändern sich die Oberflächenstruktur und die chemischen Eigenschaften des Biomaterials durch eine Sauerstoffplasmabehandlung?
2. Wie beeinflusst die Sauerstoffplasmabehandlung die Vaskularisierung von Medpor®?
3. Welche Auswirkungen hat die Sauerstoffplasmabehandlung auf die Zelladhäsion an der Oberfläche von Medpor®?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen erfolgten an BALB/c Mäusen, die aus eigener Zucht (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) stammten. Die Tiere waren zwischen 12 und 16 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 22-25g. Sie wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum in Einzelkäfigen in einem klimatisierten Raum mit 12-stündigem Tag-/Nacht-Rhythmus gehalten. Während der Versuche hatten sie freien Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum*.

Alle Versuche waren durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz in Übereinstimmung mit dem nationalen Tierschutzgesetz genehmigt (Genehmigungsnummer: 26/2012) und wurden im Sinne der europäischen Richtlinien zum Tierschutz (Direktive 2010/63/EU) und den NIH Leitlinien zum Schutz und Benutzung von Labortieren durchgeführt (NIH Publication #85-23 Rev. 1985).

5.2. Experimentelles Modell

5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Zur Untersuchung der Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® wurde das Modell der Rückenhautkammer gewählt (*Abbildung 3*). Dieses Modell eignet sich hervorragend zu repetitiven *in vivo* Analyse der Mikrozirkulation.

SANDISON [1928] entwickelte bereits 1928 ein Modell, bei dem durch eine transparente Beobachtungskammer die Mikrozirkulation am Kaninchenohr mittels Intravitalmikroskopie ausgewertet werden konnte. ENDRICH et al. [1980] untersuchte die Mikrozirkulation erstmals am Modell der Rückenhautkammer mittels Intravitalmikroskopie an nicht anästhesierten Hamstern. Durch Verwendung einer kleineren und damit leichteren Rückenhautkammer (*Abbildung 3*) ist es seit geraumer Zeit möglich, vergleichbare Untersuchungen auch bei Mäusen

durchzuführen [LEHR et al., 1993; LEUNIG et al., 1992]. Hierbei können den Tieren verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe in den retrobulbären Venenplexus appliziert werden, um mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Mikrozirkulation bereits bestehender Gefäße und die Entstehung neuer Blutgefäße beobachten zu können. Gegenüber anderen Mikrozirkulationsmodellen bietet die Rückenhautkammer den entscheidenden Vorteil, dass die Entstehung neuer Blutgefäße repetitiv über eine Zeitspanne von 2-3 Wochen analysiert werden kann.

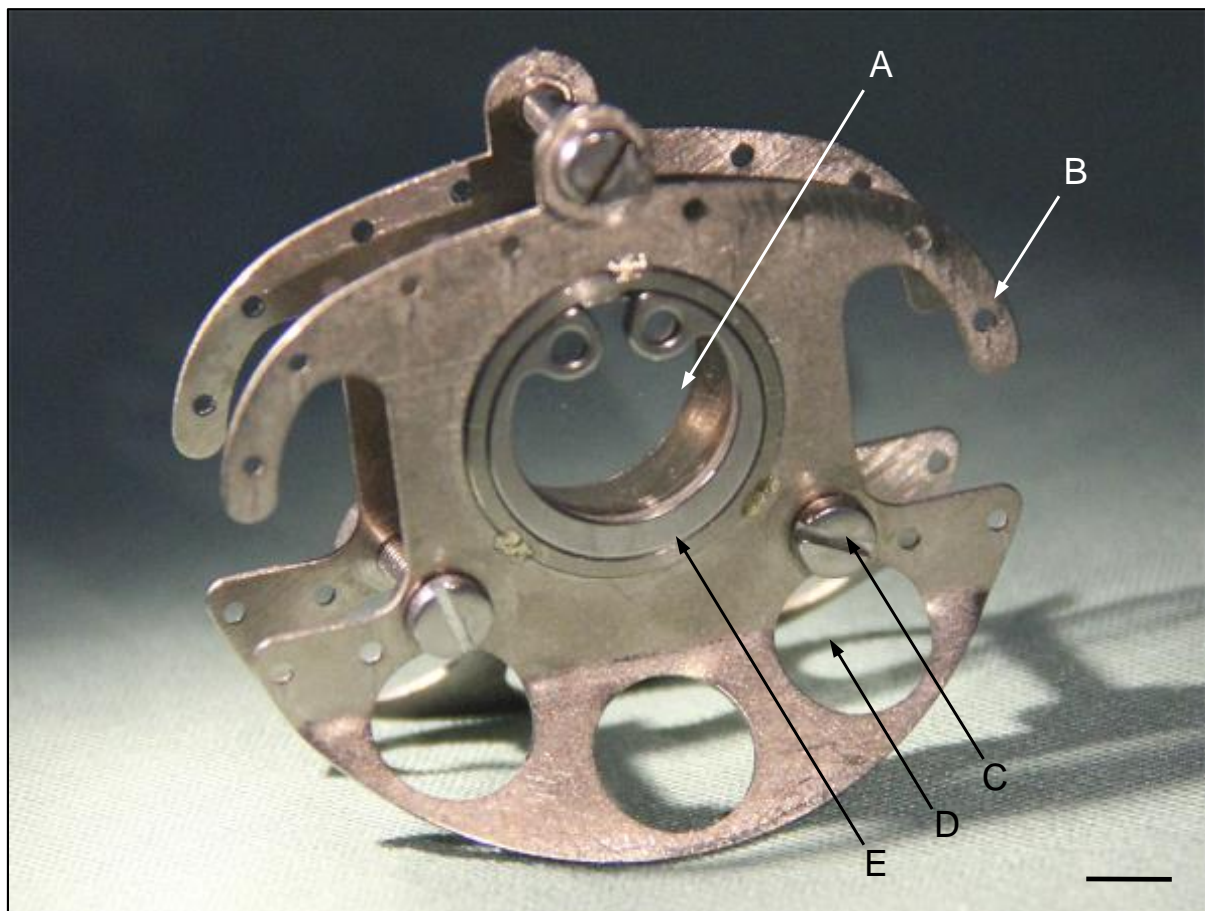


Abbildung 3: Rückenhautkammer bestehend aus zwei symmetrischen Titanrahmen und zentralem Beobachtungsfenster (Gewicht: ~2,2g). A: Beobachtungsfenster, verschlossen mit Deckglas und Sprengring; B: Bohrungen für Haltefäden; C: Verbindungsschraube; D: Gewichtsreduzierende Materialaussparung; E: Sprengring zur Fixation des Deckglases. Maßstab: 3mm.

Inzwischen wurde die Rückenhautkammer (Abbildung 4) bereits in verschiedenen Studien eingesetzt, um die Vaskularisierung unterschiedlicher Transplantate und Implantate zu untersuchen (Abbildung 4B). Hierzu zählen transplantiertes Myokard und Knochenmark [FUNK et al., 1986], Langerhans-Inseln [MENDER et al., 1989, 1990a, 1991], Tumorgewebe [VAJKOCZY et al., 1998, 2000] sowie synthetische und biologische Ersatzmaterialien [MENDER et al. 1990b, 1992a; KRAFT et al., 2000].

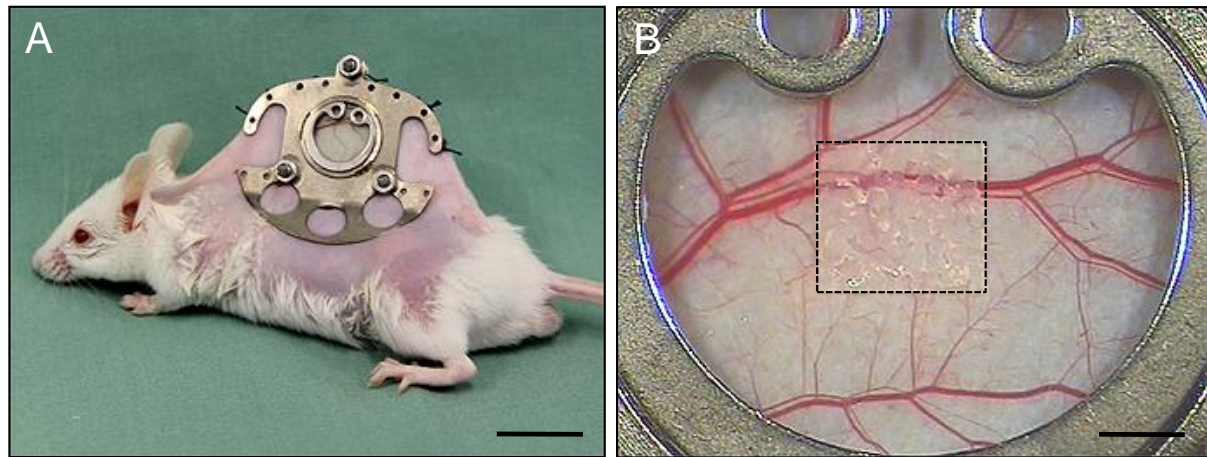


Abbildung 4: A: BALB/c Maus 48 Stunden nach Implantation einer Rückenhautkammer. B: Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer direkt nach Implantation von Medpor® (3 x 3 x 0.25mm; Rand mit gestrichelter Linie markiert). Die größeren Gefäße der Kammer (Arteriolen und Venolen des quergestreiften Muskels und des subkutanen Gewebes) sind bereits makroskopisch ohne Verwendung der hochauflösenden intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen. Maßstab: A: 1,3cm; B: 1,3mm.

5.2.2. Präparation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht; Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des Fells der Mäuse mittels Rasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und die Beseitigung der noch vorhandenen Haare durch chemische Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland). Nach Entfernung der Enthaarungscreme, Reinigung der enthaarten Rückenhaul mit warmem Wasser und Desinfektion mit 70%-igem Alkohol konnte mit der Präparation der Rückenhaulkammer begonnen werden.

Zu Beginn der Präparation wurde das Tier in Bauchlage an zwei Haltefäden cranial und caudal entlang der Rückenmittellinie fixiert. Der rückwärtige Teil der Rückenhaulkammer (*Abbildung 5A*), die aus zwei symmetrischen Titanrahmen besteht, konnte so unter Gegenlichtkontrolle am Oberrand der Hautfalte mit 5.0 Seide-Nähten über die vorgesehenen Fixationsbohrungen befestigt werden. Um den zweiten Rahmen der Kammer anbringen zu können, wurden an der Vorderseite der Kammer mittels Skalpell zwei Inzisionen im basalen Bereich der Hautfalte präpariert.

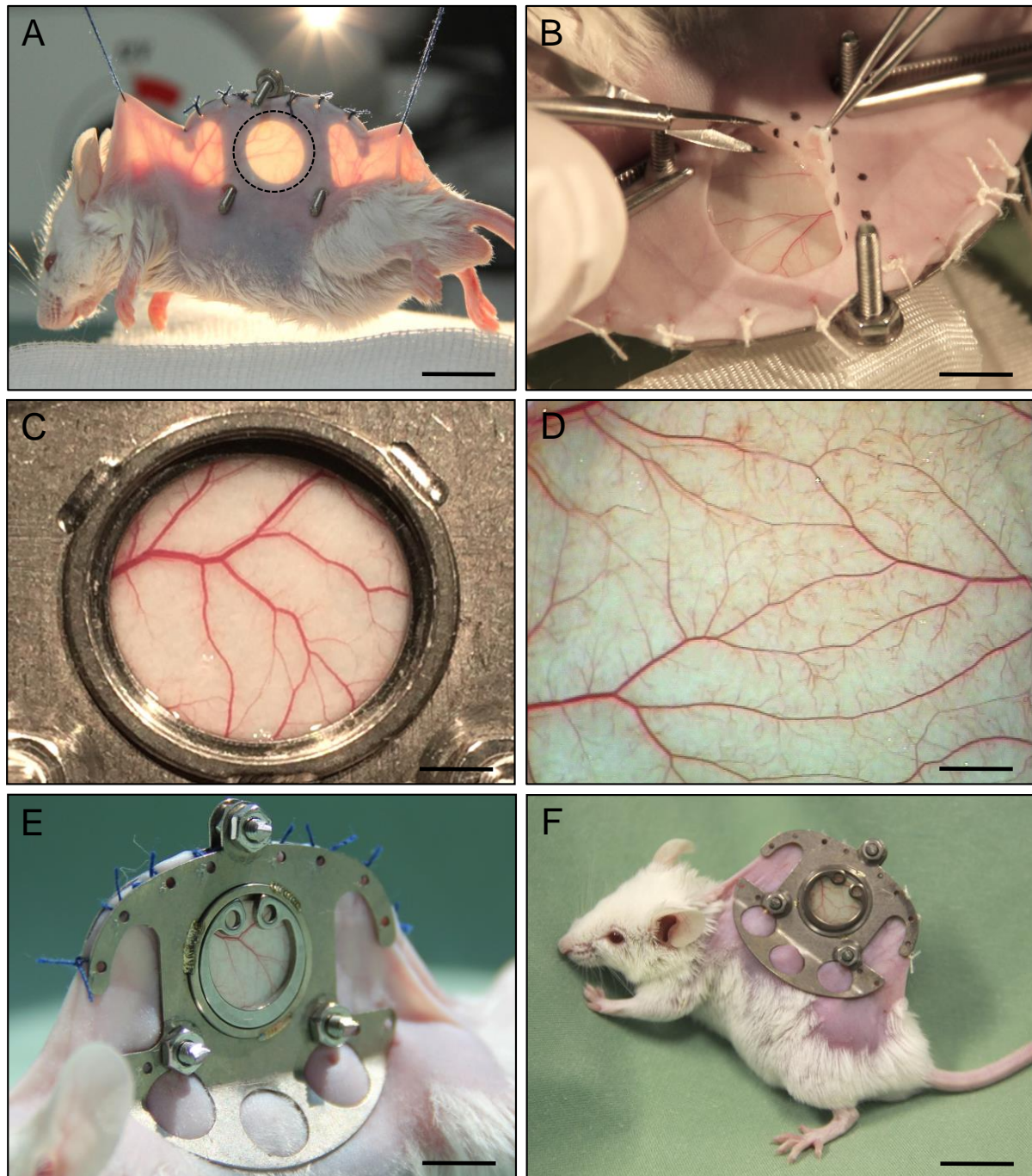


Abbildung 5: A: Implantierter hinterer Rahmen der Rückenhautkammer an einer anästhesierten BALB/c Maus. Durchleuchtung der Rückenhaut zur Markierung des Kammergewebes. B: Präparation des markierten Gewebes des späteren Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer. C: Beobachtungsfenster nach implantiertem vorderen Rahmen der Rückenhautkammer. D: Freipräparierter, quergestreifter Hautmuskel mit darunter liegender Subcutis im Bereich des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer. E: Rückenhautkammer nach Abschluss der Präparation. F: Die Tiere tolerieren die Kammer gut, was sich an ihrem normalen Orientierungsverhalten zeigt. Maßstab: A: 1,5cm; B: 5mm; C: 2mm; D: 1mm; E: 1,1cm; F: 1,4cm.

Diese Inzisionen dienten der späteren Kopplung der Verbindungsschrauben des rückseitigen Titanrahmens mit dem vorderen Rahmen. Die Schrauben wurden anschließend mit zwei Klemmen fixiert. Die Inzisionen wurden ohne Verletzung der beiden Hauptgefäßstämme gesetzt.

Zum Präparieren des späteren Beobachtungsfensters wurde unter Gegenlichtkontrolle eine runde Markierung (Skin-Marker, Ratio-Med, Lilienthal, Deutschland) mit einem Durchmesser von etwa 15mm auf die Haut aufgezeichnet (*Abbildung 5B*). Anschließend konnten die Haltefäden entfernt und das Versuchstier in Seitenlage positioniert werden. Unter Benutzung eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leitz, Schweiz) wurde dann mit Hilfe von mikrochirurgischen Instrumenten das Gewebe im Bereich des späteren Untersuchungsfensters präpariert (*Abbildung 5B*). Dort wurden die vorderseitige, vorher markierte, oberflächliche Hautschicht, die darunterliegende Subcutis, die quergestreifte Hautmuskulatur sowie beide Schichten der Retraktormuskulatur entfernt. Die verbleibenden Gewebeschichten bestanden aus rückseitiger quergestreifter Hautmuskulatur, Subcutis und Cutis (*Abbildung 6*). Der präparierte Bereich (15mm) wurde dabei absichtlich größer als der Durchmesser des Beobachtungsfensters (10mm) gewählt. So konnte eine Komprimierung des umliegenden Gewebes und eine mangelnde Blutversorgung im Bereich des Beobachtungsfensters während des Versuchs vermieden werden.

Nach der Präparation wurde das Beobachtungsfenster mit steriler Kochsalzlösung gespült, der zweite Titanrahmen auf die drei Verbindungsschrauben aufgesetzt und mit Schraubenmuttern befestigt (*Abbildung 5C*). Zwischen den beiden Rahmen befanden sich auf allen drei Verbindungsschrauben ebenfalls Stahlmuttern, um einen adäquaten Abstand (400-500µm) zwischen vorderem und hinterem Rahmen zu gewährleisten und das dazwischenliegende Gewebe nicht zu komprimieren (*Abbildung 6*). Abschließend wurde durch Adhäsion ein Deckglas auf das Beobachtungsfenster in den vorderen Rahmen aufgebracht und mit einem Sprengring gesichert (*Abbildung 5E*). Der Sprengring und das Deckglas konnten später jederzeit entfernt werden, um Zugang zum Beobachtungsfeld zu erhalten.

Nach der Kammerpräparation hatten die Versuchstiere zwei Tage Zeit, um sich von der Anästhesie und dem chirurgischen Trauma zu erholen. Eine normale Aktivität und Nahrungsaufnahme zeigte, dass die Tiere die Rückenhautkammer gut tolerierten (*Abbildung 5F*).

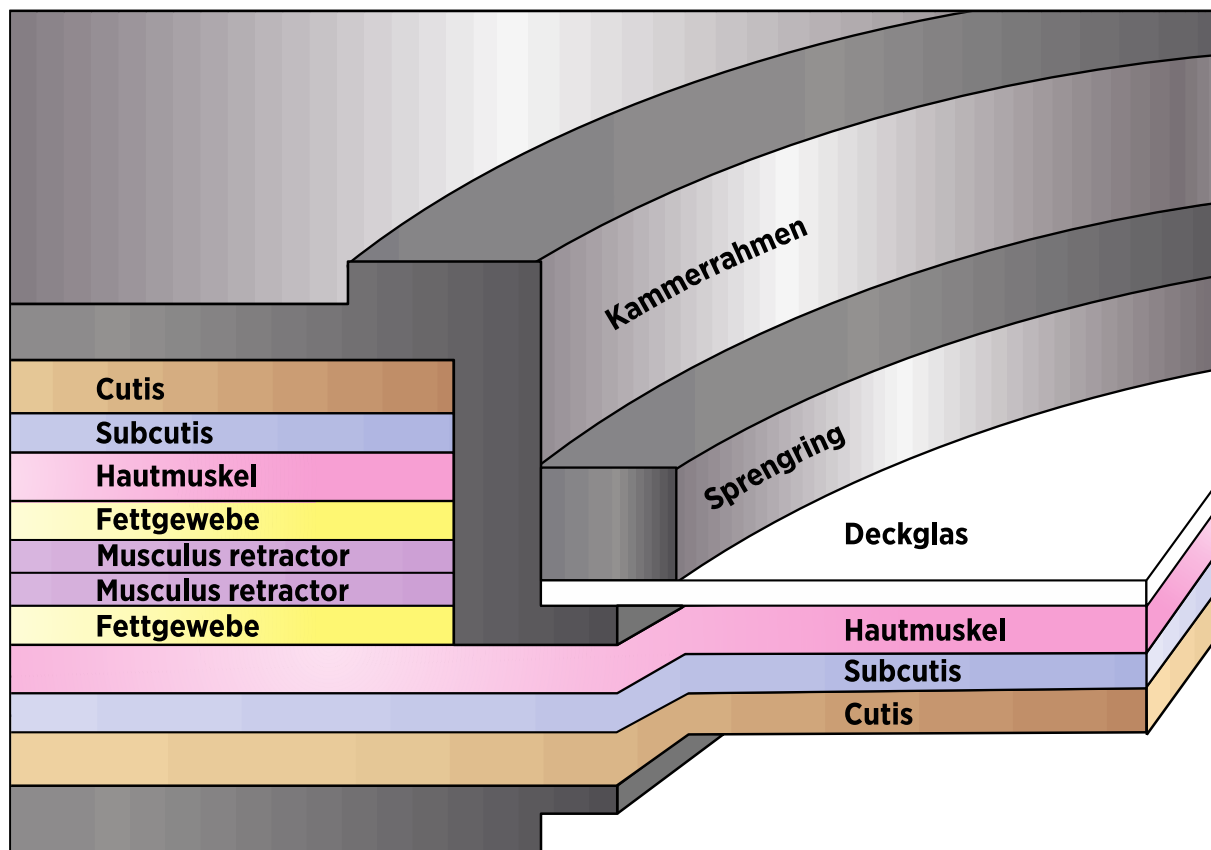


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Schichten der Rückenhautfalte (links) und in der präparierten Rückenhautkammer (rechts). Der Sprengling dient der Fixierung des Deckglases im Kammerrahmen, welches das darunterliegende Gewebe schützt.

5.2.3. Applikation von MALP-2

Das aus Mykoplasmen stammende MALP-2 (*Abbildung 7A*) [MÜHLRADT et al., 1997] wurde über MALP-2 Research (Braunschweig, Deutschland) bezogen. MALP-2 wurde bei -20°C als Vorratslösung in einer Konzentration von 1mg/ml in 30% Isopropanol gelagert. Für die Experimente wurde die Vorratslösung in 0,9% NaCl verdünnt, so dass schließlich in zwei verschiedenen Untersuchungsgruppen 0,1µg MALP-2 (low dose, LD) oder 0,5µg MALP-2 (high dose, HD) gelöst in 150µl NaCl appliziert wurden. Als Vehikel-Kontrolle diente 30% Isopropanol, das im identischen Volumen NaCl verdünnt wurde.

Zur Applikation von MALP-2 wurde zwei Tage nach Präparation der Rückenhautkammer der Sprengling und das Deckglas entfernt und die Rückenhautkammer erneut geöffnet. So konnte MALP-2 in den verschiedenen Konzentrationen lokal in das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer appliziert werden (*Abbildung 7B*). Anschließend blieben die Kammern ohne jegliche

Intervention 30 Minuten geöffnet, um eine optimale Einwirkzeit von MALP-2 zu gewährleisten.

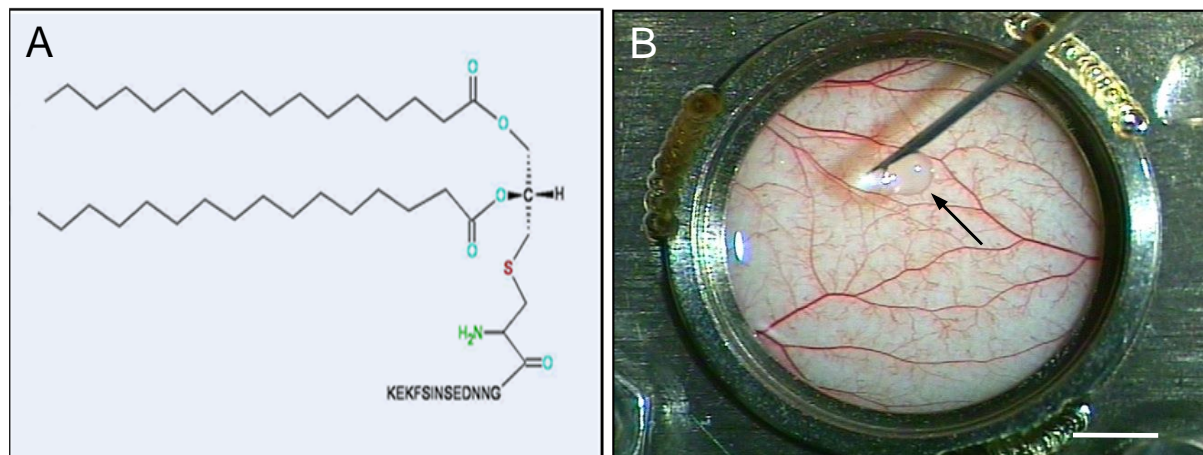


Abbildung 7: A: Strukturformel des aktiven Stereoisomers von synthetischem MALP-2 [Mühlradt, Wound Healing Research Group, Copyright © 2004]; B: Lokale Applikation von MALP-2 (Pfeil) in das offene Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer. Maßstab: B: 2mm.

5.2.4. Medpor®

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Medpor® wurde in Form von dünnen Plättchen (38 x 50 x 0,25mm) von Porex Surgical Inc (Newnan, GA, USA) erworben. Die Plättchen wurden für die Experimente mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen unter einem Stereomikroskop in kleine Proben mit einer Größe von 3 x 3 x 0,25mm geschnitten. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur in einem staubfreien Behälter aufbewahrt. So konnten sie jeder Zeit für die weiteren Versuche verwendet werden.

5.2.5. Plasmabehandlung von Medpor®

Die Oberflächenmodifikation von Medpor® mittels Sauerstoffplasmabehandlung erfolgte am Leibnitz Institut für neue Materialien (Saarbrücken, Deutschland) in Kooperation mit Herrn Dr. Cenk Aktas. Für die Plasmabehandlung wurden Medpor®-Proben (Größe: 3 x 3 x 0,25mm) auf einen Metallhalter mit einem Durchmesser von 250mm befestigt. Dieser lag im Zentrum einer kubischen Gas-Plasma-Kammer mit einer Größe von 350mm x 300mm x 430mm (Domino, Plasma Electronic, Neunburg,

Deutschland). Der Substrathalter diente als Erdungselektrode und die ganze Kammer fungierte als Gegenelektrode (asymetrische Plasmakonfiguration). Die Elektroden waren mit einem Plasma-Generator mit Radiofrequenz (RF) verbunden, der mit 13,56MHz über ein korrespondierendes Netzwerksystem funktionierte. Das Reaktionsbehältnis wurde mit 0,01mbar evakuiert und ein Sauerstofffluss von 300sccm eingestellt.

Die Proben wurden der Plasmabehandlung (*Abbildung 8*) für 300s mit einem niedrigen Energie Level von 20W und mit einem hohen Energie Level von 40W unterzogen. Entsprechend wurden die beiden Behandlungsgruppen als low energy-polyethylen (LE-PE) und high energy-polyethylen (HE-PE) bezeichnet. Als Kontrolle dienten unbehandelte Medpor®-Proben. Nachdem sich der Reaktor wieder in atmosphärischem Druck befand, konnten die Proben entnommen werden.

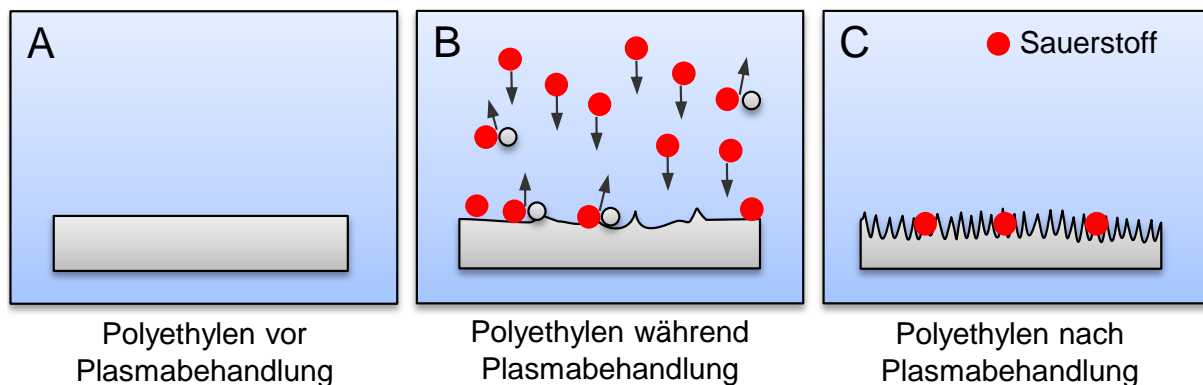


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Polyethylen-Probe vor (A), während (B) und nach Plasmabehandlung (C). Die Plasmabehandlung führt zu einer erhöhten Rauigkeit des Materials sowie zu einer Anreicherung von Sauerstoff an der Materialoberfläche.

5.2.6. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Oberflächenstruktur von Plasma-behandeltem und unbehandeltem Medpor® wurde mittels REM untersucht. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Forschungslabor der Unfallchirurgie der Universität des Saarlandes von Herrn Dr. Wolfgang Metzger durchgeführt.

Zusätzlich wurde in einer Reihe von *in vitro* Experimenten mittels REM analysiert, wie die Plasmabehandlung die Oberflächenadhäsion von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC; Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) beeinflusst (*Abbildung 9*).

Hierzu wurden 6×10^4 HDMEC auf LE-PE-Proben (n=3), HE-PE Proben (n=3) und unbehandeltes Medpor® (Kontrolle; n=3) gesiedelt. Die Besiedlung der Proben erfolgte über 6h in einem Endothelzell-Wachstumsmedium (MV ready-to-use; PromoCell GmbH) im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium entnommen und die Proben wurden zwei Mal mit Phosphat-gepuffertem Kochsalz (PBS) gespült. Danach konnten die Medpor®-Proben mit 2 vol. % Glutaraldehyd in 0,12M Natriumkacodylat-Puffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Bewegung fixiert werden. Anschließend wurden die Proben in Osmiumtetroxid (1 vol. % in deionisiertem Wasser (dH₂O)) für 2 Stunden unter Bewegung im Dunkeln inkubiert und über Nacht bei 4°C in dH₂O gelagert. Am nächsten Tag konnte das Wasser entfernt werden, indem die Proben zwei Mal eine Ethanol-Serie (30 vol. %, 50 vol. %, 70 vol. %, 80 vol. % und 90 vol. %) unter Bewegung bei 4°C über 5 Minuten durchliefen. Die Dehydratation wurde durch dreimaliges Waschen in Ethanol (100 vol. %) für 15 Minuten unter Bewegung abgeschlossen.

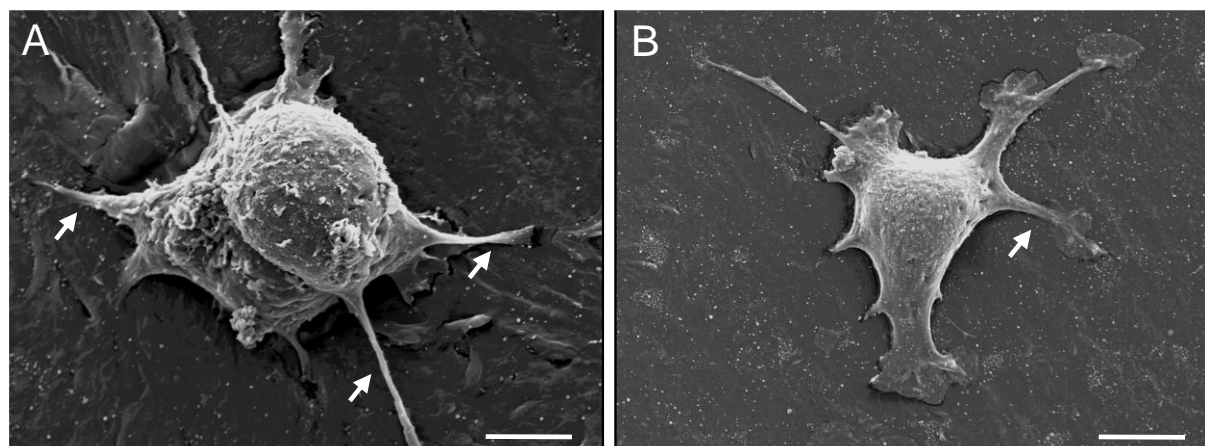


Abbildung 9: REM Aufnahmen zur Darstellung der unterschiedlichen Adhäsion und Ausbildung von Zellfortsätzen (Pfeile) der HDMEC, welche auf Medpor®-Proben gesiedelt wurden. Maßstab: A: 4,5µm; B: 5,1µm.

Die Proben konnten anschließend mit Critical-Point-Drying (Polaron, CPD 7501, Quorum Technologies, Ontario, Kanada) besprüht und mit Gold-Palladium (Polaron, Sputter Coater) getrocknet werden. Danach wurde die Oberfläche der Proben in einem FEI XL 30 ESEM FEG SEM Gerät (Hillsboro, OR, USA) im Forschungslabor der Unfallchirurgie der Universität des Saarlandes von Herrn Dr. Wolfgang Metzger analysiert.

Zusätzlich wurden die chemischen Eigenschaften der Oberfläche der unterschiedlichen Medpor®-Proben am Leibniz Institut für neue Materialien

(Saarbrücken, Deutschland) untersucht. Dabei wurden unbehandeltes Medpor® und Plasma-behandelte Proben, die entweder frisch gereinigt oder bereits acht Monate bei Raumtemperatur in einer 48-Well-Platte aufbewahrt wurden, verglichen. Zur chemischen Analyse konnte die REM (FEI Quanta 400 F, FEI) unter Röntgenfluoreszenz (EDX) mit einem EDAX Genesis Apparat (Software Version 6.04) verwendet werden. Um eine elektrostatische Leitung zu vermeiden, wurden die Proben vorsichtig mit einer dünnen Schicht von ~4nm Gold besprüht. Die Impulsenergie in einer Hochvakuumanlage von 10^{-3} mbar lag bei 2,0kV. Die emittierte Röntgen-Floureszenz an Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) wurde über 100 Sekunden aufgenommen. Auf jeder Probe wurden dazu drei repräsentative Areale (Vergrößerung 3000x) ausgewählt, um die größte Menge emittierter Röntgen-Fluoreszenzstrahlung aufzunehmen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer Software, welche die $K_{\alpha 1}$ Linien von Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) verwendete. Die Menge an Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) auf unbehandeltem Medpor® wurde mit 100% festgelegt.

5.2.7. Implantation von Medpor®

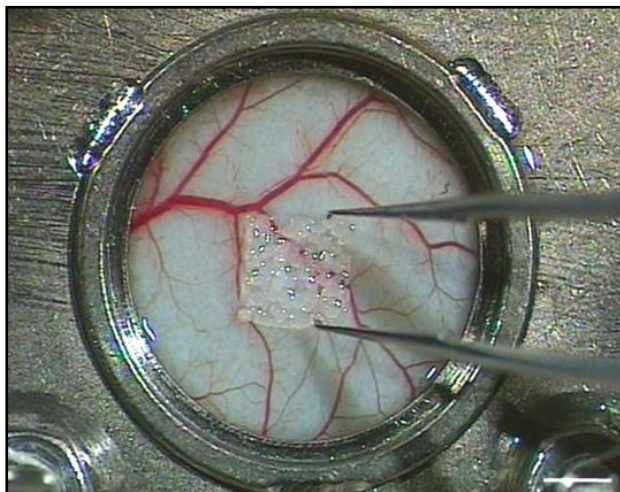


Abbildung 10: Implantation von Medpor® in das geöffnete Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer. Maßstab: 1,8mm.

Die Implantation von Medpor® fand 48 Stunden nach der Rücken-hautkammerpräparation statt (*Abbildung 10*). Die Narkose der Tiere erfolgte entsprechend der Narkose bei der Rückenhautkammerpräparation. Die narkotisierten Tiere wurden anschließend auf einer Plexiglasbühne in Seitenlage fixiert. Nach Entfernung von Sprengring und Deckglas wurden die Medpor®-Proben vorsichtig in das Zentrum

der Kammern platziert (*Abbildung 10*). Dabei wurden mechanische Irritationen des quergestreiften Muskelgewebes vermieden. Falls eine luftblasenfreie Adhäsion des Kammergewebes an das Deckglas nicht möglich war, wurden wenige Tropfen 0,9%iger NaCl-Lösung in die Kammer pipettiert, bevor diese mit einem neuen

Deckglas und Sprengring verschlossen wurde. Die Kammer blieb nun über den kompletten Untersuchungszeitraum verschlossen.

5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (*Abbildung 11*) diente der Untersuchung der Vaskularisierung des implantierten Medpors®.

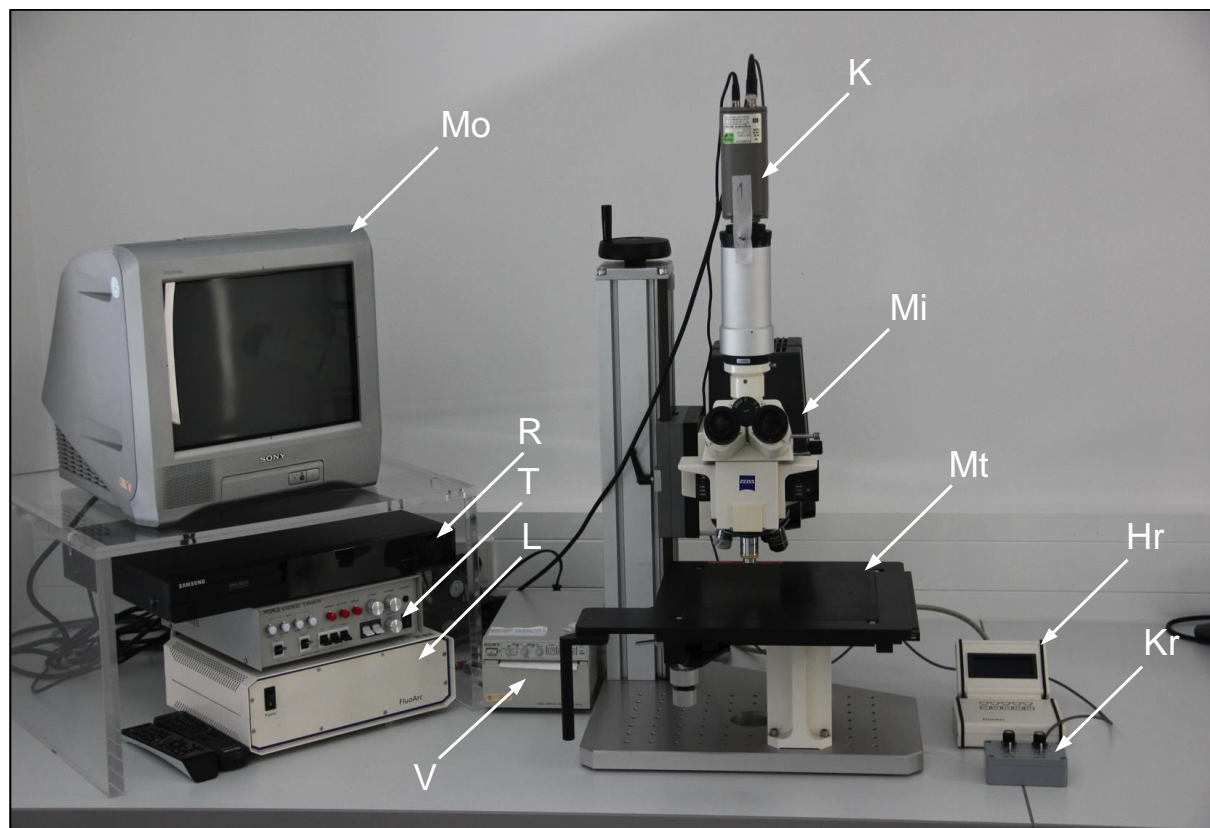


Abbildung 11: Arbeitsplatz zur Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Monitor (Mo), DVD-Rekorder (R), Videotimer (T), Lampengenerator (L), Videoprinter (V), Kamera (K), Mikroskop (Mi), Mikroskoptisch (Mt), Helligkeitsregler (Hr), Kontrastregler (Kr).

An sämtlichen Untersuchungstagen wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (75mg/kg Körpergewicht; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (15mg/kg Körpergewicht; Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Anschließend wurden den Tieren vor Untersuchungsbeginn die Fluoreszenzfarbstoffe 5% Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran; 150.000Da, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 0,1% Rhodamin-6G (Sigma-Aldrich) appliziert. Hierzu wurden beide Farbstoffe im

Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend 0,05ml der Mischung in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Dabei diente FITC-Dextran zur Darstellung perfundierter Blutgefäße mittels Kontrastverstärkung durch Anfärbung des Blutplasmas und Rhodamin-6G zur *in vivo* Markierung von Leukozyten (*Abbildung 12*).

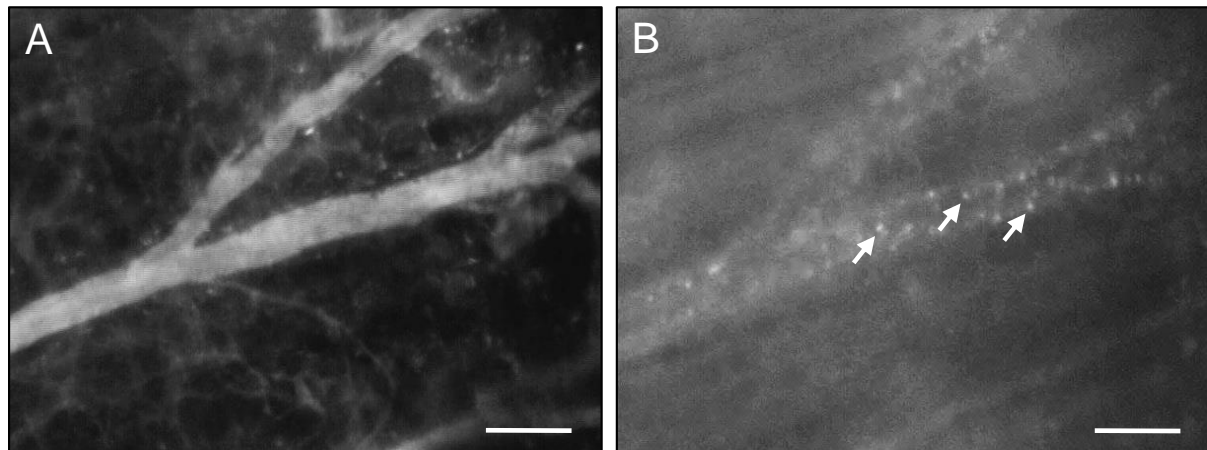


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Sammelvenole in direkter Nähe zum Implantat in der Rückenhautkammer. A: Anfärbung des Blutplasmas der Venole durch den Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination. B: Die Leukozyten werden durch Rhodamin-6G in Grünlicht-Epi-Illumination selektiv als helle Punkte (Pfeile) sichtbar. Maßstab: A, B: 80µm.

Zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mäuse in Seitenlage auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne fixiert, so dass die Rückenhautkammer zur Untersuchung horizontal unter das Mikroskop positioniert werden konnte. Zur Mikroskopie wurde ein Zeiss AxioTech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100W Quecksilberlampe für grünes, blaues und ultraviolettes Licht verwendet. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Charge-Coupled Device (CCD) Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und zur off-line Analyse auf ein DVD-System übertragen. Durch 5x, 10x und 20x Objektive mit langem Arbeitsabstand wurden Vergrößerungen von x115, x230 und x460 auf einem 36cm großen Monitor (Trinitron; Sony, Tokyo, Japan) erreicht.

5.3.1. Mikrozirkulatorische Analysen

Die über den Zeitraum von 14 Tagen aufgezeichneten intravitalmikroskopischen Bilder wurden mit dem computergestützten Bildverarbeitungssystem CapImage (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

Folgende Parameter wurden dabei untersucht: Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (5.3.1.1.), Gefäßdurchmesser (5.3.1.2.), Blutzellgeschwindigkeit (5.3.1.3.), mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (5.3.1.4.), Scherrate (5.3.1.5.), Angiogenese-positive ROIs (5.3.1.6.) und funktionelle Kapillardichte (5.3.1.7.).

5.3.1.1. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden die Leukozyten *in vivo* mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin-6G angefärbt. Auf diese Weise konnte die Interaktion der Leukozyten und Endothelzellen in vier verschiedenen Venolen in direkter Umgebung um die Implantate in einer Vergrößerung von x460 untersucht werden. Leukozyten können je nach ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel als „rollend“ oder „adhärent“ klassifiziert werden [HOFFMANN et al., 2004; LASCHKE et al., 2009]. Durch Margination und kurzzeitigen Endothelkontakt kommt es bei rollenden Leukozyten zu einer verlangsamten Fließgeschwindigkeit. Rollende Leukozyten werden als Zellen definiert, deren Fließgeschwindigkeit niedriger als zwei Fünftel des Blutflusses im Zentrum des Gefäßes beträgt. Zur Messung der rollenden Leukozyten wurde während der Auswertung eine Markierungslinie durch die entsprechende Venole gezogen und die rollenden Leukozyten nach Passage dieser Referenzlinie pro Minute gezählt.

Adhärente Leukozyten werden als Zellen definiert, die sich in einer Beobachtungsperiode von 20s nicht vom Endothel lösen. Die adhärenenten Leukozyten wurden pro mm² Endotheloberfläche angegeben, wobei eine zylindrische Gefäßgeometrie angenommen wurde.

5.3.1.2. Gefäßdurchmesser

Neben der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde von den vier analysierten Venolen zusätzlich der Gefäßdurchmesser bestimmt. Der Durchmesser wurde durch Markierung der Randpunkte der jeweiligen Venole gemessen. So konnte eine senkrecht zum Gefäßverlauf liegende Strecke am Videostandbild gezogen und die Länge in µm ermittelt werden.

5.3.1.3. Blutzellgeschwindigkeit

Die Blutzellgeschwindigkeit (v ; $\mu\text{m/s}$) wurde an den identischen vier Venolen gemessen, an denen zuvor auch die anderen Parameter bestimmt worden waren. Die Messung erfolgte durch die computerassistierte Line-Shift-Diagramm-Methode [DE VRIESE et al., 2000]. Dazu wurde eine Messlinie im Zentrum des Gefäßes entlang des Blutflusses gezogen (*Abbildung 13A*). Daraufhin wurde die DVD für etwa 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Während des Abspielens konnte für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erzeugt werden und gleichzeitig in einem Bildspeicher aufgezeichnet werden. Aus den Grauwertprofilen konnte das Programm ein Line-Shift-Diagramm erzeugen, in dem helle und dunkle schräge Linien zu sehen waren (*Abbildung 13B*). Diese entstanden durch Plasmalücken oder Erythrozyten, die sich im Bereich der Messlinie im Untersuchungszeitraum bewegten. Aus der Steigung der schrägen Linien konnte daraufhin die Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ errechnet werden.

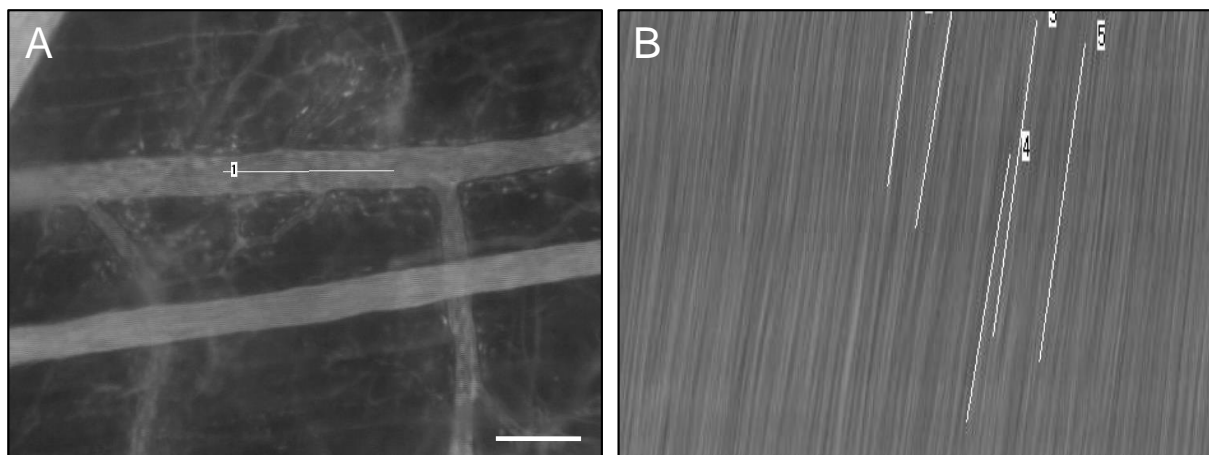


Abbildung 13: A: Messung der Blutzellgeschwindigkeit in einer Venole. Dazu wird eine Messlinie im Zentralstrom eines Gefäßes gelegt. Maßstab: $84\mu\text{m}$. B: Line-Shift-Diagramm mit hellen und dunklen schrägen Linien. Die Blutzellgeschwindigkeit lässt sich anhand der Steigung der schrägen Linien bestimmen. Zur Messung wurden 5 Linien entlang der Grauwertprofile eingezeichnet und daraus ein Mittelwert errechnet.

5.3.1.4. Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss

Zur Bestimmung des mikrovaskulären volumetrischen Blutflusses innerhalb eines Gefäßes wurde die Blutzellgeschwindigkeit (v) und der Gefäßdurchmesser (d) verwendet. Dazu musste die Blutzellgeschwindigkeit (v) mit dem Gefäßdurchmesser (d) nach folgender Formel multipliziert werden:

$$\text{Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times v/1,6 \text{ (pl/s)}$$

Der Wert 1,6 beschreibt den Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor [BAKER und WAYLAND, 1974], durch den das parabole Geschwindigkeitsprofil von Gefäßen über >20µm korrigiert wird. Ohne den Korrekturfaktor würde es zu einer Überschätzung der Fließgeschwindigkeit kommen, weil durch das parabole Geschwindigkeitsprofil die Fließgeschwindigkeit im Randbereich niedriger als im Zentrum des Gefäßes ist.

5.3.1.5. Scherrate

Als weiterer mikrohämodynamischer Parameter wurde die Scherrate (y) errechnet. Grundlage zur Berechnung der Scherrate (y) war die Newton'sche Definition:

$$y = 8 \times v/d \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

Dabei steht d für den Gefäßdurchmesser und v für die Blutzellgeschwindigkeit.

5.3.1.6. Angiogenese-positive ROIs

Die Vaskularisierung der Implantate wurde in 460-facher Vergrößerung in acht definierten Beobachtungsfeldern (ROIs = regions of interest; Größe: 0,4mm²) im Randbereich (vier ROIs an den Ecken und vier ROIs zwischen zwei Ecken) und acht ROIs im Zentrum untersucht. Diese Felder wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt in identischer Weise aufgenommen. Die ROIs wurden als Angiogenese-positiv (in Prozent aller analysierter ROIs) gewertet, wenn Zeichen der Angiogenese zu sehen waren. Dazu zählte Blutgefäßwachstum in Form von Kapillarknospen und -sprossen oder das Vorhandensein von neugebildeten perfundierten Kapillaren, die bereits in die Implantate eingewachsen waren.

5.3.1.7. Funktionelle Kapillardichte

Zusätzlich zu den Angiogenese-positiven ROIs wurde die funktionelle Kapillardichte gemessen. Als funktionelle Kapillardichte wird die Gesamtlänge aller Erythrozyten-

perfundierter Kapillaren pro Beobachtungsfeld bezeichnet. Sie wurde ebenfalls mit dem Computerprogramm CapImage gemessen und in cm/cm^2 angegeben [LASCHKE et al., 2012]. Hierfür wurden alle neu gebildeten, mit Erythrozyten perfundierten Gefäße in den jeweiligen Beobachtungsfeldern im Standbild auf dem Bildschirm markiert und deren Gesamtlänge gemessen. Die funktionelle Kapillardichte errechnete sich dann als Quotient aus der Gesamtlänge der neugebildeten Kapillaren und der Fläche der ROI.

5.4. Experimentelles Protokoll

5.4.1. Versuchsablauf Studienabschnitt 1

Im ersten Studienabschnitt wurde in 32 BALB/c Mäusen eine Rückenhautkammer implantiert. Danach konnten sich die Tiere für 48 Stunden von dem chirurgischen Trauma erholen. Anschließend wurde MALP-2 in niedriger (LD = low dose; $n=8$) oder hoher (HD = high dose; $n=8$) Dosierung sowie als Kontrollgruppe der Vehikel von MALP-2 (Kontrolle; $n=8$) lokal auf das freipräparierte Gewebe der Rückenhautkammer appliziert. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten erfolgte die Implantation von Medpor® in die Mitte des Beobachtungsfensters. Danach wurde die Rückenhautkammer wieder verschlossen.

Vor jeder intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erfolgten DVD-Aufzeichnungen des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer mit einem konventionellen Operationsmikroskop in 25- und 40-facher Vergrößerung.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde sowohl am Tag der Medpor®-Implantation (Tag 0) als auch am 3., 6., 10., und 14. Tag durchgeführt (*Abbildung 14*). Dazu wurden den Versuchstieren vor den Untersuchungen die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (5%) und Rhodamin-6G (0,1%) durch retrobulbäre Injektion appliziert.

Nach der letzten intravitalmikroskopischen Untersuchung am 14. Tag wurden die Tiere mit einer Überdosis Narkose eingeschläfert und die Rückenhautkammer-Präparationen für histologische und immunhistochemische Untersuchungen asserviert.

In zusätzlichen Experimenten wurde in 8 weiteren Tieren eine Rückenhautkammer implantiert. Nach 48 Stunden erfolgte eine lokale MALP-2

Applikation in hoher Dosierung (HD MALP-2; n=4) bzw. des Vehikels (n=4) auf das freipräparierte Rückenhautkammerngewebe, ohne dass anschließend Medpor® implantiert wurde. Die nachfolgenden intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob durch MALP-2 auch Angiogenese in Biomaterial-freien Kammern induziert wird. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde dazu die Dichte an neugebildeten, perfundierten Gefäßen in 16 Untersuchungsfeldern (ROIs; Größe 0,4mm²) analysiert.

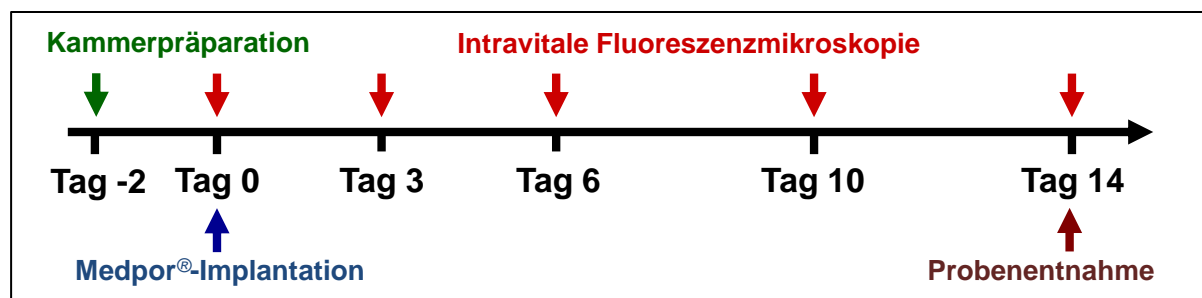


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

5.4.1.1. Untersuchungsgruppen

Folgende Gruppen wurden in diesem Studienabschnitt analysiert:

- Medpor® + Vehikel (Kontrolle, n=8)
- Medpor® + 0,1µg MALP-2 (LD MALP-2, n=8)
- Medpor® + 0,5µg MALP-2 (HD MALP-2, n=8)
- Leere Rückenhautkammer + Vehikel (Kontrolle leer, n=4)
- Leere Rückenhautkammer + 0,5µg MALP-2 (HD MALP-2 leer, n=4)

5.4.2. Versuchsablauf Studienabschnitt 2

Im 2. Studienabschnitt der Arbeit wurde in 24 BALB/c Mäusen eine Rückenhautkammer implantiert. Anschließend erhielten sich die Tiere 48 Stunden von der Präparation. Danach wurden die zuvor der Plasmabehandlung unterzogenen Medpor®-Implantate in das Fenster der Rückenhautkammer implantiert. Je nach Vorbehandlung der Implantate wurden die Gruppen mit LE-PE- (n=8), HE-PE- (n=8)

und Kontroll-Gruppe (unbehandeltes Medpor; n=8) bezeichnet. Es wurden DVD-Aufzeichnungen des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer mit dem konventionellen Operationsmikroskop in 25 und 40facher Vergrößerung angefertigt. Anschließend erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung nach Implantation (Tag 0) und an den Tagen 3, 6, 10 und 14 (*Abbildung 14*). Nach den *in vivo* Versuchen wurden die Tiere mit einer Überdosis des Narkotikums eingeschläfert und die Rückenhautkammer-präparationen für histologische und immunhistochemische Untersuchungen asserviert.

5.4.2.1. Untersuchungsgruppen

Folgende Gruppen wurden in diesem Studienabschnitt analysiert:

- Medpor® unbehandelt (Kontrolle, n=8)
- Medpor® + low-energy Polyethylen (LE-PE, n=8)
- Medpor® + high-energy Polyethylen (HE-PE, n=8)

5.4.3. Analyseprotokoll

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dauerten etwa 20 Minuten pro Tier und Untersuchungstag. Dabei wurden folgende Parameter analysiert:

1. Anzahl der rollenden Leukozyten (5.3.1.1.)
2. Anzahl der adhärenen Leukozyten (5.3.1.1.)
3. Gefäßdurchmesser (5.3.1.2.)
4. Blutzellgeschwindigkeit (5.3.1.3.)
5. Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (5.3.1.4.)
6. Scherrate (5.3.1.5.)
7. Angiogenese-positive ROIs (5.3.1.6.)
8. Funktionelle Kapillardichte (5.3.1.7.)

An allen Untersuchungstagen wurde in vier ausgewählten postkapillaren Venolen in der unmittelbaren Nähe der Implantate die oben angegebenen Parameter 1-5 gemessen (*Abbildung 15A*). Um den Anteil Angiogenese-positiver ROIs zu bestimmen, wurden im Randbereich und im Zentrum der Medpor®-Implantate je 8

ROIs aufgenommen. Innerhalb dieser ROIs wurde die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Gefäße untersucht (*Abbildung 15B*). Als perfundiert galten die Felder, in denen neugebildete, mit Erythrozyten perfundierte Gefäße zu sehen waren.

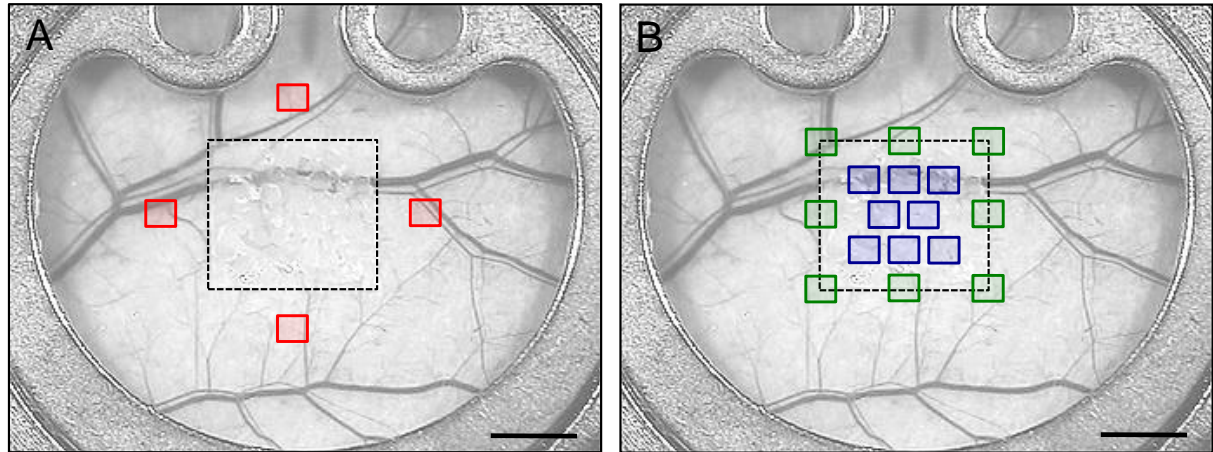


Abbildung 15: Lokalisation der verschiedenen ROIs für die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Analysen. A: Untersuchung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und mikrohämodynamischer Parameter in 4 verschiedenen ROIs in unmittelbarer Umgebung des implantierten Biomaterials (rot). B: Untersuchung der Angiogenese in 8 verschiedenen ROIs am Rand (grün) und im Zentrum (blau) der Medpor®-Implantate (gestrichelte Linie). Maßstab: A, B: 1,6mm.

5.5. Histologie und Immunhistochemie

5.5.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Nach der letzten intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung am 14. Tag wurde das Rückenhautkammerngewebe mit den Implantaten exzidiert. Anschließend wurden die Proben in 4%-iger Formaldehydlösung bei 20°C für 24 Stunden fixiert. Nach Einbettung in Paraffin konnten Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 2µm angefertigt werden. Diese wurden in beiden Studienabschnitten mit HE nach Standardprotokoll gefärbt. Anhand dieser Präparate ließ sich die Inkorporation der Medpor®-Implantate im neugebildeten Granulationsgewebe histomorphologisch beurteilen (*Abbildung 16A*).

5.5.2. Sirius Red-Färbung

Im zweiten Studienabschnitt wurden weitere Schnitte mit Sirius Red angefärbt, um so die Kollagenfasern im neugebildeten Granulationsgewebe um die Medpor®-Implantate visualisieren zu können. In der Sirius Red-Färbung sind Kollagenfasern rot, während sich das Zytoplasma von Zellen und Muskelfasern gelb anfärbt.

5.5.3. CD31-Färbung

Die CD31-Färbung diente zur immunhistochemischen Analyse der Gefäßdichte im Granulationsgewebe um die Implantate (*Abbildung 16B*). Für diese Untersuchung wurden die Schnitte in beiden Studienabschnitten mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus-Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (1:30; Dianova, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Ein Ziege-anti-Ratte IgG cyanine 3 (Cy3) Antikörper (Dianova) diente als Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (1:500; Sigma-Aldrich) markiert.

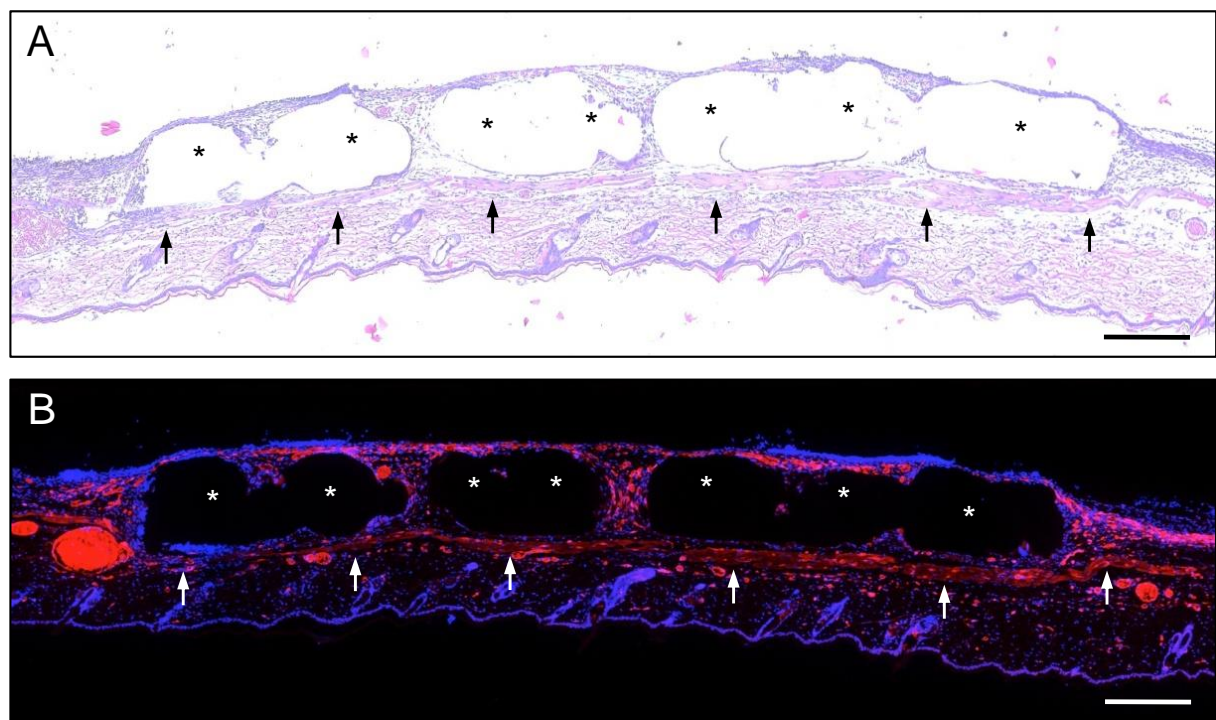


Abbildung 16: Panorama-Aufnahmen HE- (A) und CD31- (B) gefärbter Schnitte der Rückenhautkammer. Die Medpor®-Implantate (Sternchen) liegen gut inkorporiert im neugebildeten Granulationsgewebe auf dem quergestreiften Muskel der Rückenhautkammer (Pfeile). B: Neugebildete CD31-positive Gefäße (rot). Maßstab: A: 230µm B: 250 µm.

Die Gefäßdichte (in mm^{-2}) wurde anschließend mit einem BZ-8000 Mikroskopiesystem (Keyence, Osaka, Japan) quantitativ analysiert. Hierzu wurde im ersten Studienabschnitt jeweils ein repräsentativer Schnitt von 8 Implantaten und im zweiten Studienabschnitt jeweils ein repräsentativer Schnitt von 6 Implantaten pro Gruppe untersucht.

5.5.4. F4/80-Färbung

Im ersten Studienabschnitt der Arbeit wurde zusätzlich die Makrophagendichte im Granulationsgewebe um die Implantate untersucht. Zur immunhistochemischen Anfärbung von Makrophagen wurde ein polyklonaler anti-F4/80-Kaninchen Antikörper (1:50; Abcam, Cambridge, Großbritannien) als primärer Antikörper verwendet. Auf diesen folgte ein Biotin-markierter Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper (ready-to-use; Abcam). Als Chromogen zum Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion wurde 3,3'-Diaminobenzidin benutzt. Die Schnitte wurden mit Hämalun nach Mayer gegengefärbt (Merck, Darmstadt, Deutschland) und lichtmikroskopisch (BX60; Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Die Dichte F4/80-positiver Makrophagen im Granulationsgewebe (in mm^{-2}) wurde in 8 Proben pro Gruppe quantitativ gemessen.

5.5.5. Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS)- und Arginase (Arg)-1-Färbung

iNOS und Arg1 dienen der Markierung von M1-polarisierten entzündlichen Makrophagen und M2-polarisierten Makrophagen, die dafür bekannt sind, pro-angiogene Wachstumsfaktoren auszuschütten. Für die Färbungen wurde ein polyklonaler Kaninchen-Anti-iNOS Antikörper bzw. ein Kaninchen-Anti-Arg1 Antikörper (iNOS: Abcam; Arg1: Sigma-Aldrich) als Primärantikörper verwendet. Bei der iNOS-Färbung wurde dieser im Verhältnis 1:50 und bei der Arg1-Färbung im Verhältnis 1:200 verdünnt. Als Sekundärantikörper diente ein Biotin-markierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. Mit diesen Färbungen konnte beurteilt werden, wie sich die Applikation von MALP-2 auf die Akkumulation der unterschiedlichen Makrophagentypen im Granulationsgewebe um die Implantate auswirkt.

5.6. Statistik

Sämtliche erhobene Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und Varianzgleichheit untersucht. Anschließend konnten die Unterschiede in den verschiedenen Gruppen mittels ANOVA gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test mit Korrektur des α -Fehlers nach Bonferroni analysiert werden.

Alle Werte wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben. Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Für sämtliche statistische Tests wurde das Software Paket SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet.

6. ERGEBNISSE

6.1. Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer

Das Gewebe der Rückenhautkammer wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie während des gesamten Beobachtungszeitraums über zwei Wochen fünf Mal untersucht (Abbildung 17). Zur Visualisierung der Mikrozirkulation diente der Plasmamarker FITC-Dextran (5%), der aufgrund seines hohen Molekulargewichts (150.000Da) unter physiologischen Bedingungen eine nur geringe bzw. keine Extravasation aufweist.

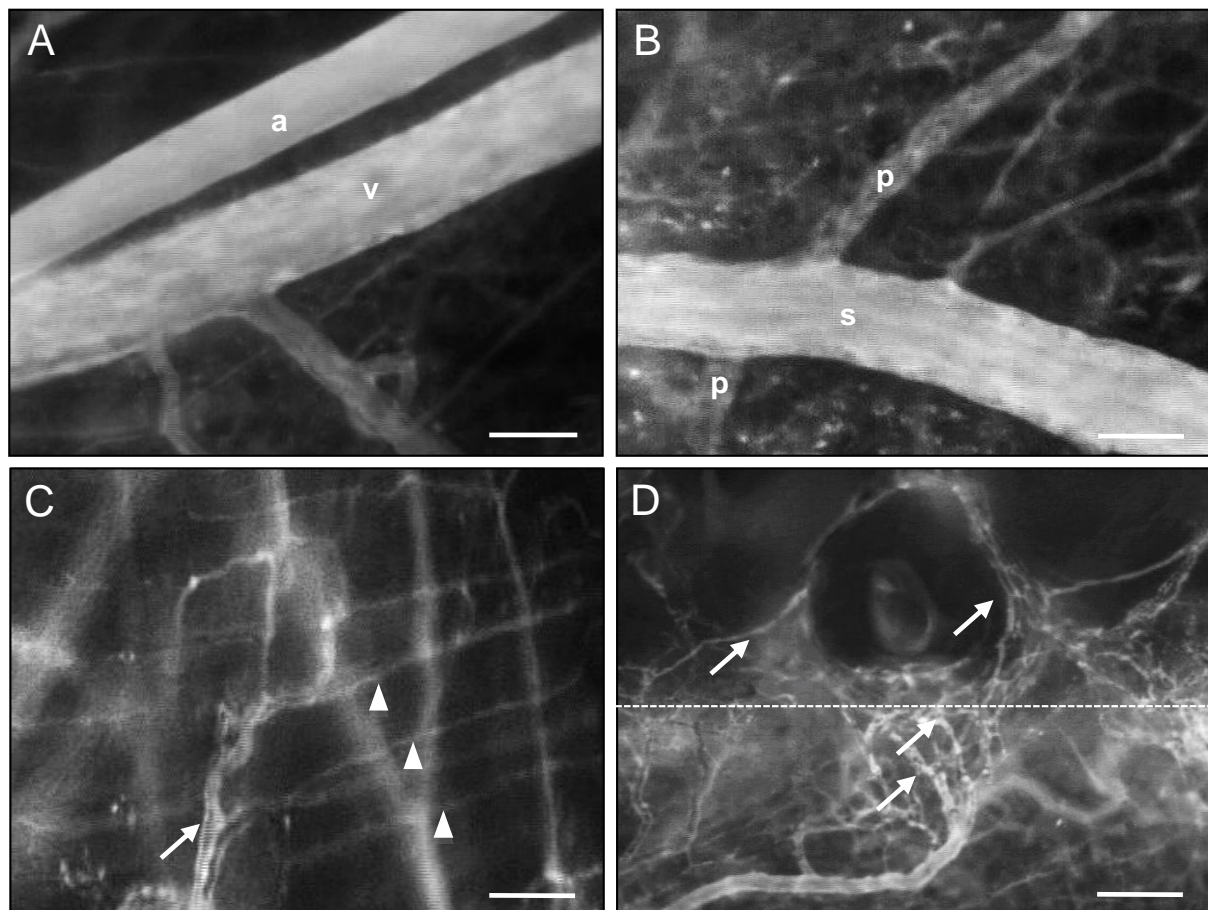


Abbildung 17: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedenerer Gefäßabschnitte in der Rückenhautkammer. A: Arteriole (a) und Venole (v) lassen sich durch die unterschiedliche Wandstruktur und Fließgeschwindigkeit unterscheiden. B: Postkapillare Venolen (p) münden in eine große Sammelenole (s). C: Kapillaren (Pfeilspitzen) in typischem parallelen Verlauf. Die Kapillaren werden von einer Arteriole (Pfeil) gespeist. D: Perfundiertes, auf einem Medpor®-Implantat (obere Bildhälfte ab gestrichelter Linie) wachsendes Gefäßnetzwerk (Pfeile) 14 Tage nach Implantation. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran. Maßstab: A: 70µm; B: 80µm; C: 50µm; D: 145µm.

Das Gefäßsystem im Bereich des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer besteht aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen (*Abbildung 17A*). Die Gefäße können leicht voneinander differenziert werden, da die Arteriolen ($d = 40\text{-}60\mu\text{m}$) einen geradlinigeren Verlauf, eine glatte Wandstruktur und eine schnellere Fließgeschwindigkeit aufweisen. Sie verzweigen sich im Verlauf in einem Winkel von $120\text{-}150^\circ$ noch ein bis zwei Mal in kleinere Arteriolen ($d = 20\text{-}40\mu\text{m}$). Diese versorgen die Kapillaren mit oxygeniertem Blut (*Abbildung 17C*). Die Kapillaren sind gut erkennbar, da sie parallel in einem Abstand von ca. $50\text{-}60\mu\text{m}$ angeordnet sind (*Abbildung 17C*). Teilweise stehen sie durch Quervernetzungen miteinander in Verbindung. Die Kapillaren münden in postkapillare Venolen ($d = 20\text{-}40\mu\text{m}$), die das Blut wiederum in Sammelvenolen ($d = 40\text{-}120\mu\text{m}$) drainieren (*Abbildung 17B*). Die Venolen unterscheiden sich von den Arteriolen durch die Fließrichtung des Blutes, eine langsamere Fließgeschwindigkeit und eine ungleichmäßigere Wandstruktur.

Die Mikrozirkulation im Bereich des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer verändert sich entscheidend nach Implantation eines Biomaterials. Neugebildete Gefäßsprossen beginnen im Gefäßbett um das Implantat zu wachsen und es bildet sich schließlich ein neues mikrovaskuläres Gefäßnetzwerk aus (*Abbildung 17D*).

6.2. Vaskularisierung von Medpor® nach MALP-2 Applikation

6.2.1. Vaskularisierung von implantiertem Medpor®

In allen drei Gruppen induzierten die Medpor®-Implantate eine angiogene Reaktion im Empfängergewebe (*Abbildung 18*), die bereits am 3. Tag nach Implantation beobachtet werden konnte. Diese angiogene Reaktion war gekennzeichnet durch Kapillardilatationen und die Ausbildung von Gefäßknospen und -sprossen, die aus den Kapillaren und postkapillaren Venolen des Empfängergewebes stammen (*Abbildung 18B*). Aus den neugebildeten Gefäßen entstanden im Laufe des 14-tägigen Beobachtungszeitraums mit Blut gefüllte, perfundierte mikrovaskuläre Netzwerke, die in die Poren des implantierten Medpors® einwuchsen (*Abbildung 18C und D*).

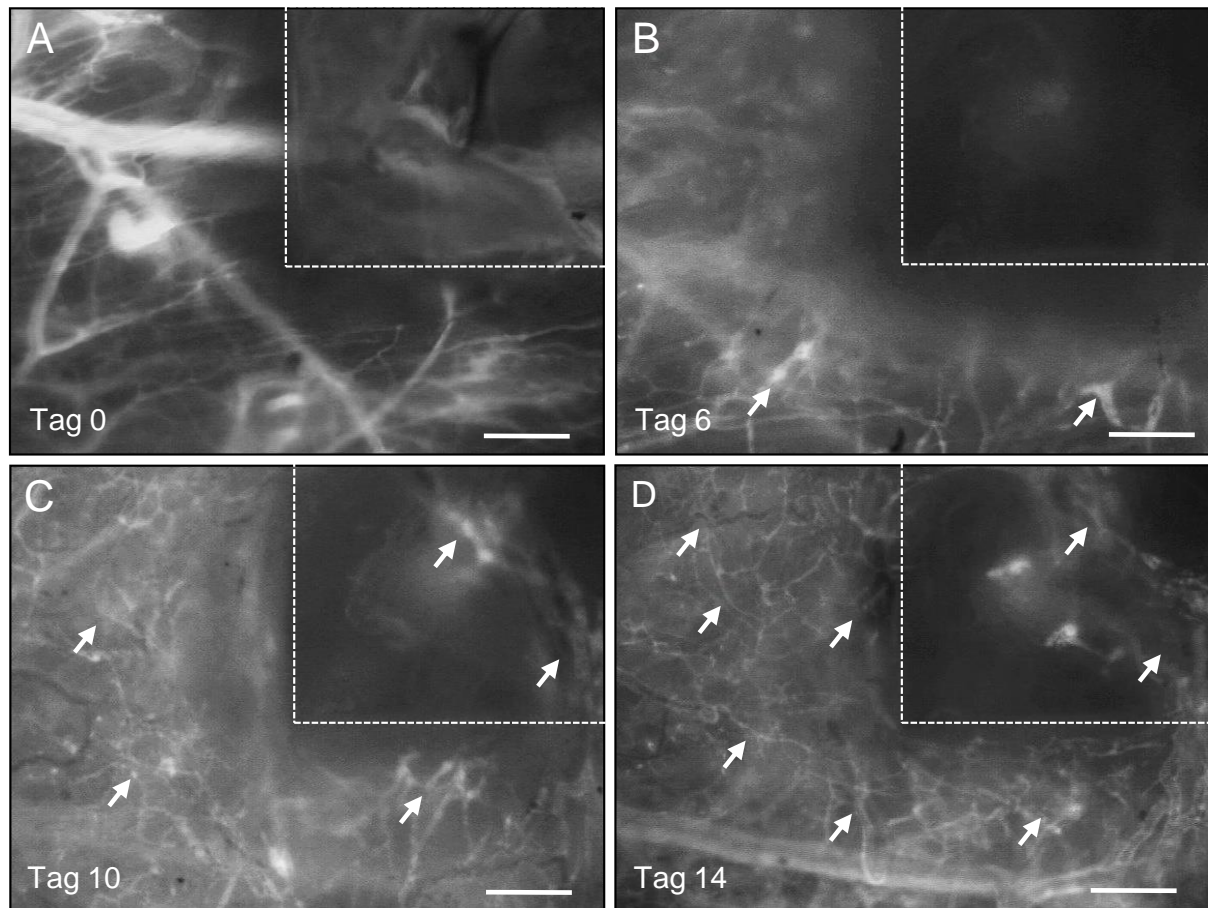


Abbildung 18: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Rückenhautkammer direkt nach Implantation (A) von Medpor® (gestrichelte Linie) sowie am 6. (B), 10. (C) und 14. (D) Untersuchungstag. Im Zeitverlauf entstehen neue mikrovaskuläre Gefäßnetzwerke (Pfeile) um das Implantat. Kontrastverstärkung durch 5% FITC-markiertes Dextran 150.000 i.v.. Maßstab: A-D: 130µm.

6.2.1.1. Angiogenese-positive ROIs

In den Rückenhautkammern, die lokal mit MALP-2 stimuliert wurden (Abbildung 19B und C), war die Vaskularisierung der Implantate im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollen (Abbildung 19A) beschleunigt. Entsprechend wiesen sie bereits am 6. Tag nach Implantation eine signifikant erhöhte Zahl Angiogenese-positiver ROIs im Randbereich auf (Abbildung 20A).

Im Zentrum der Implantate lag ab dem 6. bis zum 10. Tag nach Implantation eine signifikant höhere Anzahl Angiogenese-positiver ROIs in der HD MALP-2 Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen vor (Abbildung 20B). Die neugebildeten Gefäße konnten im Zentrum oft erst detektiert werden, sobald sie durch die Poren des Medpors® durchgewachsen waren. In der LD MALP-2 Gruppe

konnten am 6. Tag nach Implantation im Zentrum der Implantate signifikant mehr Angiogenese-positive ROIs im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden (Abbildung 20B).

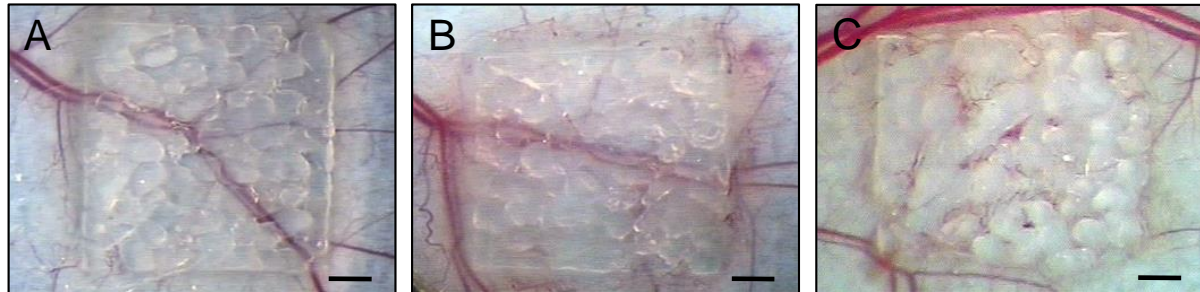


Abbildung 19: Stereomikroskopie von Medpor®-Implantaten am Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. In das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einzaldosis LD MALP-2 (B), HD MALP-2 (C) oder Vehikel (Kontrolle; A) appliziert. Das Implantat der HD MALP-2 Gruppe (C) weist eine verbesserte Vaskularisierung mit vielen perfundierten Blutgefäßen im Vergleich zu den anderen beiden Implantaten auf. Maßstab: A-C: 520µm.

Am 14. Tag nach Implantation lag die Anzahl der Angiogenese-positiven ROIs in den drei Untersuchungsgruppen im Randbereich der Implantate wieder auf selbem Niveau (Abbildung 20A). Im Zentrum war allerdings weiterhin ein dosisabhängiger Unterschied zu erkennen (Abbildung 20B).

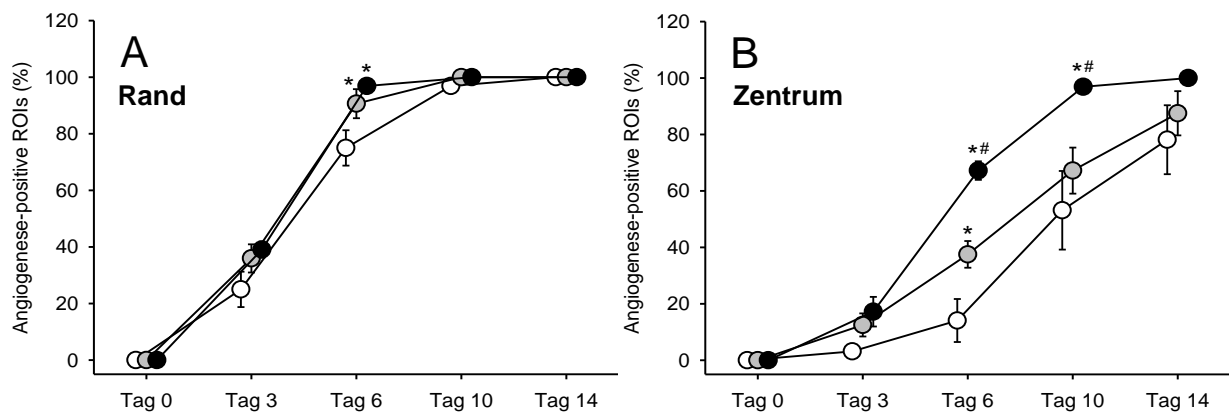


Abbildung 20: Angiogenese-positive ROIs (%) im Randbereich (A) und Zentrum (B) der Medpor®-Implantate direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. In das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einzaldosis LD MALP-2 (graue Kreise, n=8), HD MALP-2 (schwarze Kreise, n=8) oder Vehikel (Kontrolle; weiße Kreise, n=8) appliziert. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; # $P < 0,05$ vs. LD MALP-2.

6.2.1.2. Funktionelle Kapillardichte

Neben der Untersuchung der ROIs auf Angiogenese wurde auch die funktionelle Kapillardichte bestimmt. Bei der Untersuchung der funktionellen Kapillardichte war deutlich zu sehen, dass MALP-2 die frühe Vaskularisierung der Medpor®-Implantate dosisabhängig verbessert (Abbildung 21 und 22).

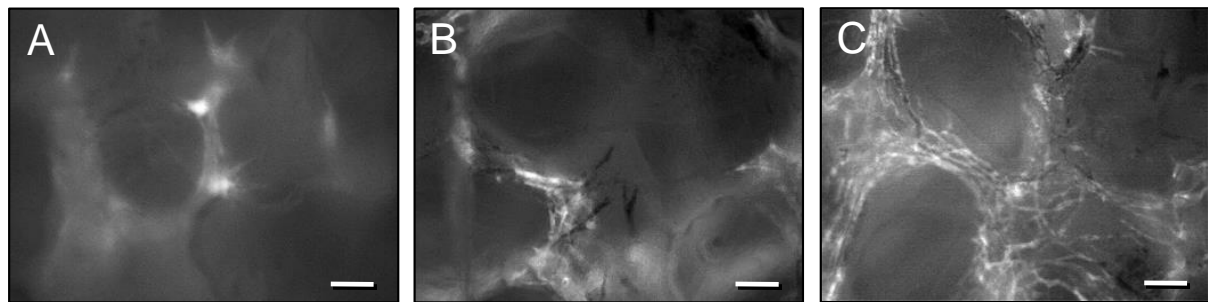


Abbildung 21: Intravital Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination am 14. Tag nach Implantation von Medpor® in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Kontrastverstärkung durch 5% FITC-markiertes Dextran 150,000 i.v.. In das Kammergewebe wurde LD MALP-2 (B), HD MALP-2 (C) oder Vehikel (Kontrolle; A) 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens appliziert. Das Implantat der HD MALP-2 Gruppe (C) weist eine verbesserte Vaskularisierung mit vielen perfundierten Blutgefäßen im Vergleich zu den anderen beiden Implantate auf. Maßstab: A-C: 64µm.

Die Vaskularisierung der Implantate in der LD MALP-2 Gruppe zeigte sowohl im Randbereich (Abbildung 22A) als auch im Zentrum (Abbildung 22B) über den gesamten Zeitverlauf keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

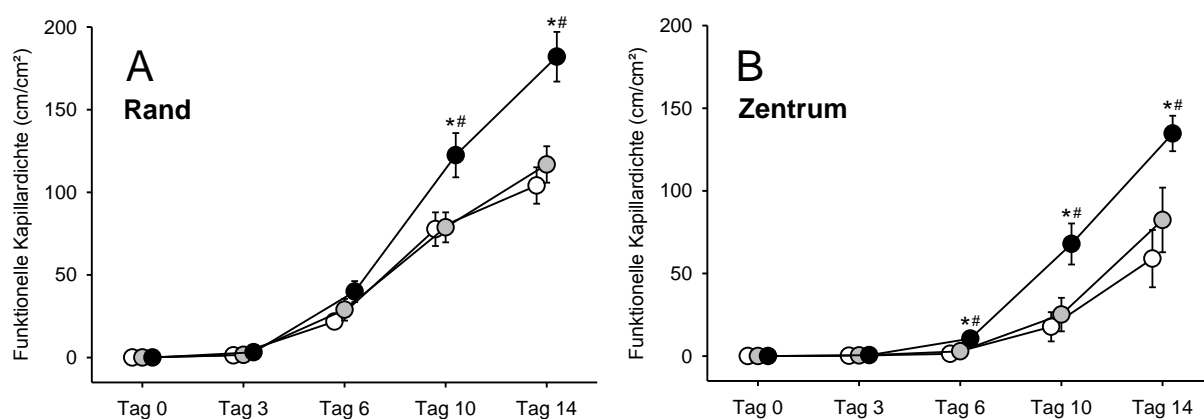


Abbildung 22: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) im Randbereich (A) und Zentrum (B) der Medpor®-Implantate direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Auf das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einmaldosis LD MALP-2 (graue Kreise, n=8), HD MALP-2 (schwarze Kreise, n=8) oder Vehikel (Kontrolle; weiße Kreise, n=8) appliziert. Mittelwerte ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. LD MALP-2.

Die Applikation von HD MALP-2 führte hingegen sowohl am Rand als auch im Zentrum der Implantate zu einer schnellen Ausbildung von mikrovaskulären Netzwerken (*Abbildung 21C*). Dies zeigte sich im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen durch eine signifikant erhöhte funktionelle Kapillardichte nach HD MALP-2 Applikation im Randbereich der Implantate am 10. und 14. Tag (*Abbildung 22A*). Im Zentrum war die funktionelle Kapillardichte der HD MALP-2 Gruppe bereits ab dem 6. Tag im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erhöht (*Abbildung 22B*).

6.2.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Durch retrobulbäre Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin-6G konnte das Fließverhalten der Leukozyten untersucht werden. Zur Untersuchung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion dienten die postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in der Umgebung der Implantate. Dabei lag der Durchmesser der untersuchten Venolen in allen Gruppen zwischen 34-38µm und die Blutzellgeschwindigkeit zwischen 336-573µm/s. Entsprechend errechnete sich ein mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss von 185-391pl/s und eine Scherrate von 83-124s⁻¹ ohne signifikante Unterschiede über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum (*Tabelle 1*).

Nach Applikation von LD MALP-2 war keine Zunahme der Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Gefäßendothel zu erkennen (*Abbildung 23A und B*).

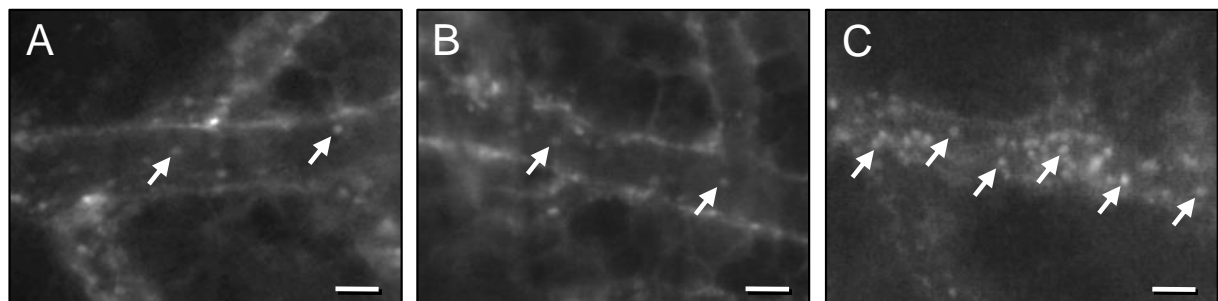


Abbildung 23: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Grünlicht-Epi-Illumination von Venolen in der Umgebung von Medpor®-Implantaten am 3. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Auf das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einzeldosis LD MALP-2 (B), HD MALP-2 (C) oder Vehikel (Kontrolle; A) appliziert. Die Venole der HD MALP-2 Gruppe enthält eine deutlich höhere Zahl Rhodamin-6G-gefärbter Leukozyten (C, Pfeile) im Vergleich zu den Venolen der anderen beiden Gruppen (A, B, Pfeile). Maßstab: A-C: 31 µm.

Durchmesser [μm]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Kontrolle | 37,9 \pm 1,1 | 35,4 \pm 0,9 | 35,7 \pm 1,0 | 34,4 \pm 1,0 | 36,5 \pm 1,0 |
| LD MALP-2 | 36,5 \pm 1,1 | 35,3 \pm 1,0 | 37,2 \pm 1,0 | 35,5 \pm 1,2 | 36,7 \pm 1,1 |
| HD MALP-2 | 36,1 \pm 0,8 | 37,1 \pm 1,0 | 36,8 \pm 1,1 | 36,2 \pm 1,2 | 36,2 \pm 1,3 |

Blutzellgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Kontrolle | 572,8 \pm 75,9 | 501,7 \pm 64,5 | 451,7 \pm 54,0 | 335,7 \pm 85,8 | 506,6 \pm 58,4 |
| LD MALP-2 | 450,1 \pm 61,4 | 486,2 \pm 33,9 | 472,3 \pm 47,3 | 416,7 \pm 63,1 | 516,7 \pm 73,1 |
| HD MALP-2 | 384,3 \pm 43,5 | 453,7 \pm 27,9 | 500,7 \pm 66,1 | 374,2 \pm 43,7 | 432,4 \pm 62,1 |

Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss [pl/s]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Kontrolle | 391,9 \pm 40,8 | 315,1 \pm 50,4 | 285,5 \pm 38,8 | 185,0 \pm 40,1 | 332,9 \pm 45,6 |
| LD MALP-2 | 287,8 \pm 38,4 | 299,7 \pm 29,7 | 321,3 \pm 34,8 | 257,1 \pm 39,8 | 339,2 \pm 45,1 |
| HD MALP-2 | 243,8 \pm 26,5* | 313,7 \pm 32,8 | 332,5 \pm 43,5 | 244,7 \pm 37,7 | 276,7 \pm 39,5 |

Scherrate [s^{-1}]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| Kontrolle | 124,1 \pm 19,7 | 113,1 \pm 13,5 | 101,6 \pm 12,4 | 80,8 \pm 22,3 | 111,8 \pm 13,2 |
| LD MALP-2 | 100,6 \pm 14,7 | 110,7 \pm 7,6 | 102,3 \pm 10,9 | 95,2 \pm 15,5 | 114,3 \pm 18,4 |
| HD MALP-2 | 85,9 \pm 10,3 | 97,4 \pm 4,4 | 109,7 \pm 15,3 | 83,0 \pm 9,2 | 97,3 \pm 15,8 |

Tabelle 1: Durchmesser (μm), Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$), mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (pl/s) und Scherrate (s^{-1}) von postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in der Umgebung von Medpor®-Implantaten direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation. Auf das Gewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einmaldosis LD MALP-2 ($n=8$), HD MALP-2 ($n=8$) oder Vehikel (Kontrolle; $n=8$) appliziert. Mittelwert \pm SEM. * $P<0,05$ vs. Kontrolle.

Wie auch in der Kontrollgruppe lagen die Werte der rollenden und adhärenen Leukozyten während des gesamten Untersuchungszeitraums unter 20 min^{-1} und 200 mm^{-2} (Abbildung 24). Diese Werte sind charakteristisch für physiologische Bedingungen in nicht entzündetem Gewebe [RÜCKER et al., 2006].

Im Vergleich dazu induzierte die lokale Applikation von HD MALP-2 eine temporäre leukozytäre Reaktion (Abbildung 23C). Diese war durch eine signifikant erhöhte Zahl adhärenen Leukozyten in den ersten drei Tagen nach Medpor®-Implantation gekennzeichnet (Abbildung 24B).

Ab dem 6. Tag konnten wieder physiologische Zahlen für rollende und adhärenen Leukozyten gemessen werden. Somit induzierte HD MALP-2 nur eine temporäre leukozytäre Entzündungsreaktion während der ersten drei Untersuchungstage nach Medpor®-Implantation (Abbildung 24).

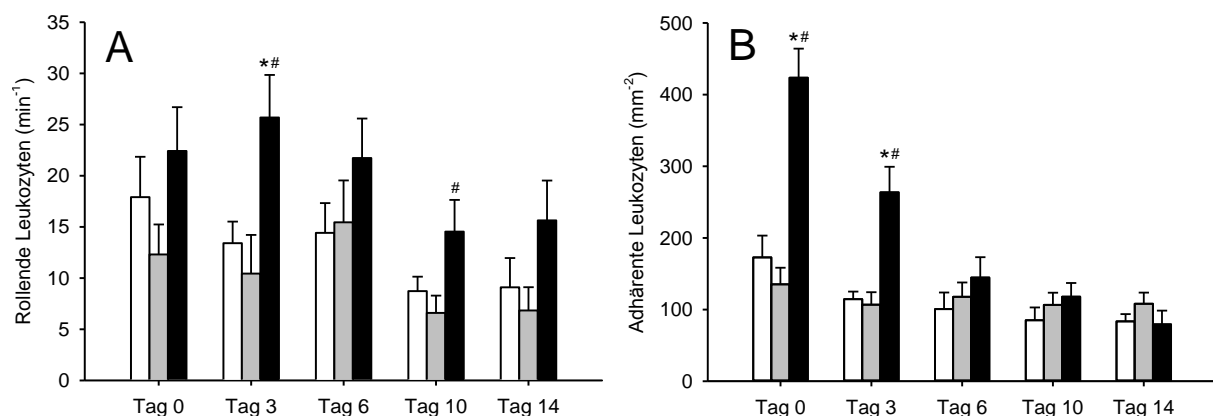


Abbildung 24: Anzahl der rollenden Leukozyten (min^{-1}) (A) und adhärenen Leukozyten (mm^{-2}) (B) in Venolen in der Umgebung von Medpor®-Implantaten direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Auf das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einzaldosis LD MALP-2 (graue Balken, $n=8$), HD MALP-2 (schwarze Balken, $n=8$) oder Vehikel (Kontrolle; weiße Balken, $n=8$) appliziert. Mittelwert \pm SEM. * $P<0,05$ vs. Kontrolle; # $P<0,05$ vs. LD MALP-2.

6.2.3. Histologie und Immunhistochemie

Das neugebildete Granulationsgewebe um die Implantate konnte durch zusätzliche histologische Untersuchungen beurteilt werden. Hierbei waren die HE-gefärbten Präparate der beiden MALP-2 Gruppen von deutlich dichterem Granulationsgewebe im Vergleich zur Kontrolle umgeben (Abbildung 25A-C).

Zusätzlich wurden immunhistochemische Analysen des Granulationsgewebes durchgeführt. Die Unterschiede in der Gefäßdichte des Granulationsgewebes der drei Gruppen waren mit den Ergebnissen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie vergleichbar (Abbildung 25D-F). So lag in der HD MALP-2 Gruppe eine signifikant erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen vor (Abbildung 26A).

Weitere lichtmikroskopische Untersuchungen mit dem Makrophagenmarker F4/80 bestätigten die vorherigen Ergebnisse (Abbildung 25G-I). Die Anzahl F4/80 positiver Makrophagen war in der HD MALP-2 Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erhöht (Abbildung 26B).

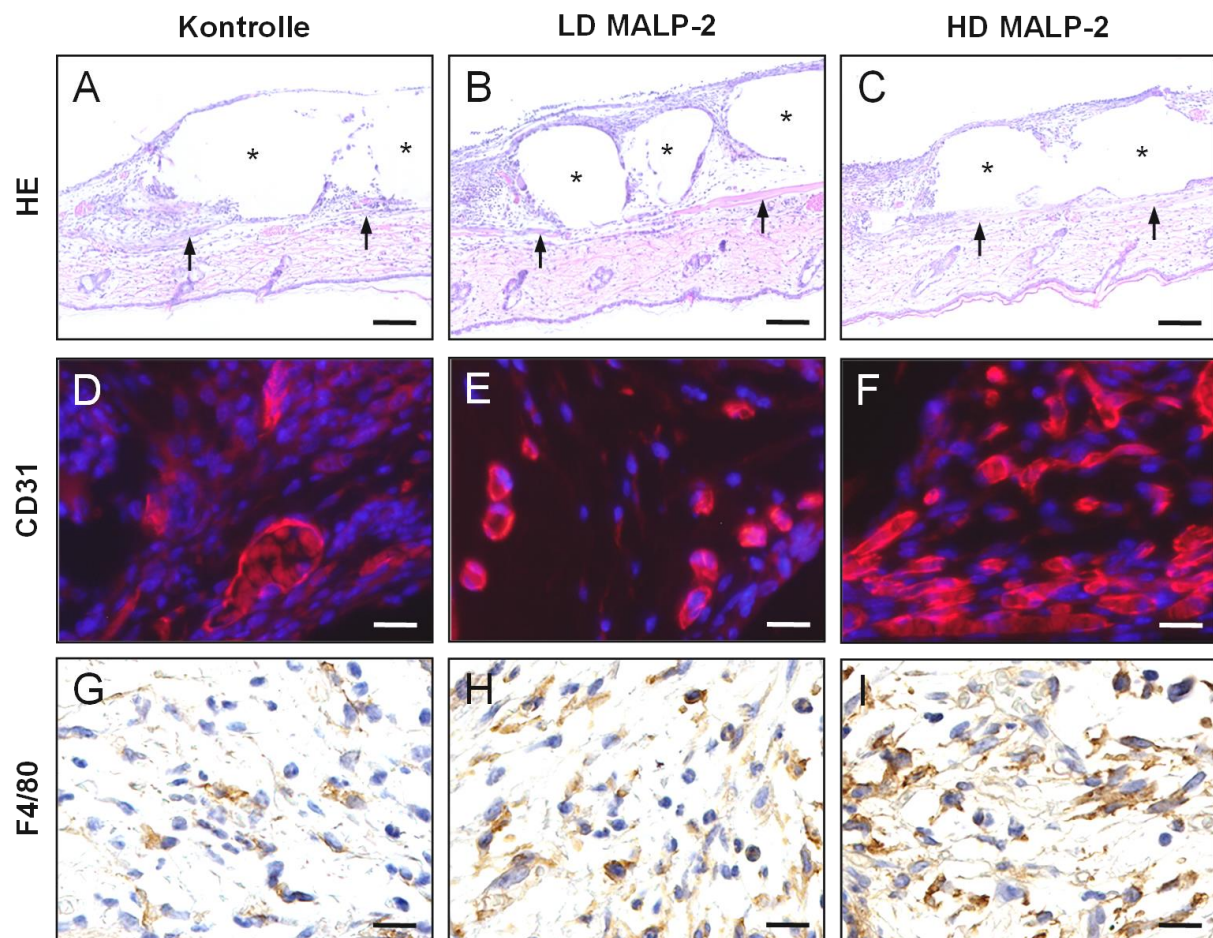


Abbildung 25: A-C: HE-gefärbte Schnitte von Medpor®-Implantaten (Sternchen) am 14. Tag nach Implantation auf den Muskel (Pfeile) der Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Auf das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einzeldosis LD MALP-2 (B), HD MALP-2 (C) oder Vehikel (Kontrolle; A) appliziert. Die Implantate aller 3 Gruppen sind von neugebildetem Granulationsgewebe umgeben. Maßstab: 115µm. D-I: CD31-gefärbte (D-F, rot) und F4/80-gefärbte (G-I, braun) Schnitte der von Granulationsgewebe umgebenen Implantate. Das Granulationsgewebe des HD MALP-2 Implantats weist eine höhere Dichte CD31-positiver Gefäße (F) und eine höhere Anzahl F4/80-positiver Makrophagen (I) im Vergleich zu den beiden anderen Implantaten (D,E und G,H) auf. Maßstab: D-F: 19µm; G-I: 15µm.

Die Untersuchung der M1- und M2-polarisierten Makrophagen zeigte, dass es einen Unterschied in der Dichte von iNOS-positiven M1-polarisierten und Arg-1-positiven M2-polarisierten Makrophagen gab. Bei dieser Analyse war mit zunehmender MALP-2 Konzentration ein Shift von M1- zu M2-polarisierten Makrophagen erkennbar. So lag das Verhältnis von M1:M2 polarisierten Makrophagen in der Kontrollgruppe bei 1:0,6 und in der LD MALP-2 Gruppe bei 1:0,7. Dagegen lag in der HD MALP-2 Gruppe das Verhältnis bei 1:0,9. Dies passt sehr gut zu den übrigen Ergebnissen, da M2-polarisierte Makrophagen dafür bekannt sind, pro-angiogen wirkende Wachstumsfaktoren auszuschütten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die höhere Anzahl M2-polarisierter Makrophagen in direktem Zusammenhang mit der verbesserten Vaskularisierung steht.

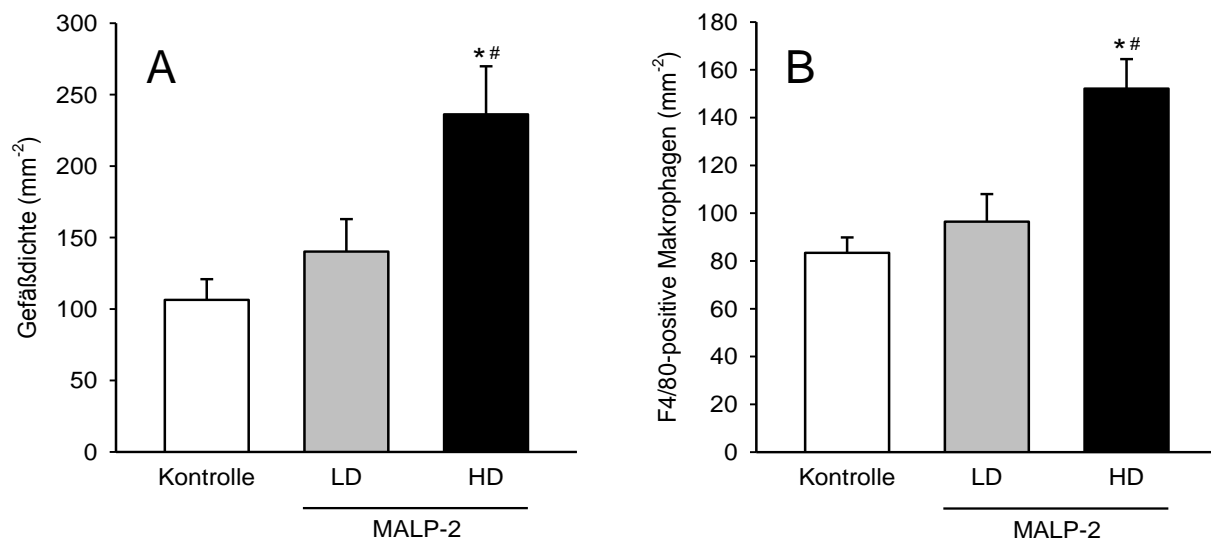


Abbildung 26: Gefäßdichte (mm²) (A) und Anzahl F4/80-positiver Makrophagen (mm²) (B) im Granulationsgewebe um die Medpor®-Implantate am 14. Tag nach Implantation. Auf das Kammergewebe wurde 30 Minuten vor Implantation des porösen Polyethylens eine Einzeldosis LD MALP-2 (graue Balken, n=8), HD MALP-2 (schwarze Balken, n=8) oder Vehikel (Kontrolle; weiße Balken, n=8) appliziert. Mittelwert \pm SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. LD MALP-2.

6.2.4. Wirkung von MALP-2 in biomaterialfreiem Gewebe

Zusätzlich wurde untersucht, ob die topische Applikation von MALP-2 auch eine angiogene Reaktion im biomaterialfreien Gewebe hervorruft. Dazu wurde HD MALP-2 in vier biomaterialfreie Rückenhautkammern lokal appliziert (Abbildung 27C). Als Kontrolle diente erneut das Vehikel von MALP-2 (Abbildung 27A).

Interessanterweise hatte die MALP-2 Behandlung im implantatfreien Gewebe keine pro-angiogene Wirkung auf das Kammergewebe (*Abbildung 27B und D*). Im Vergleich zu den Messungen am Rand und im Zentrum des implantierten Medpors® war die Dichte an neugebildeten, mit Blutzellen perfundierten Gefäßen in biomaterialfreien, MALP-2-behandelten Kammern über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum sehr gering (Tag 0: $0,0 \pm 0,0$; Tag 3: $0,0 \pm 0,0$; Tag 6: $0,1 \pm 0,1$; Tag 10: $0,1 \pm 0,1$; Tag14: $0,3 \pm 0,0 \text{ cm/cm}^2$).

Dabei zeigte die Vehikel behandelte Kontrollgruppe ähnliche Ergebnisse (Tag 0: $0,0 \pm 0,0$; Tag 3: $0,0 \pm 0,0$; Tag 6: $0,1 \pm 0,1$; Tag 10: $0,1 \pm 0,1$; Tag 14: $0,3 \pm 0,1 \text{ cm/cm}^2$). Auch die Struktur und die Dichte der Kapillaren des quergestreiften Muskelgewebes in der HD MALP-2 Gruppe unterschied sich im gesamten Zeitraum nicht von derjenigen der Kontrolle (*Abbildung 27C und D*).

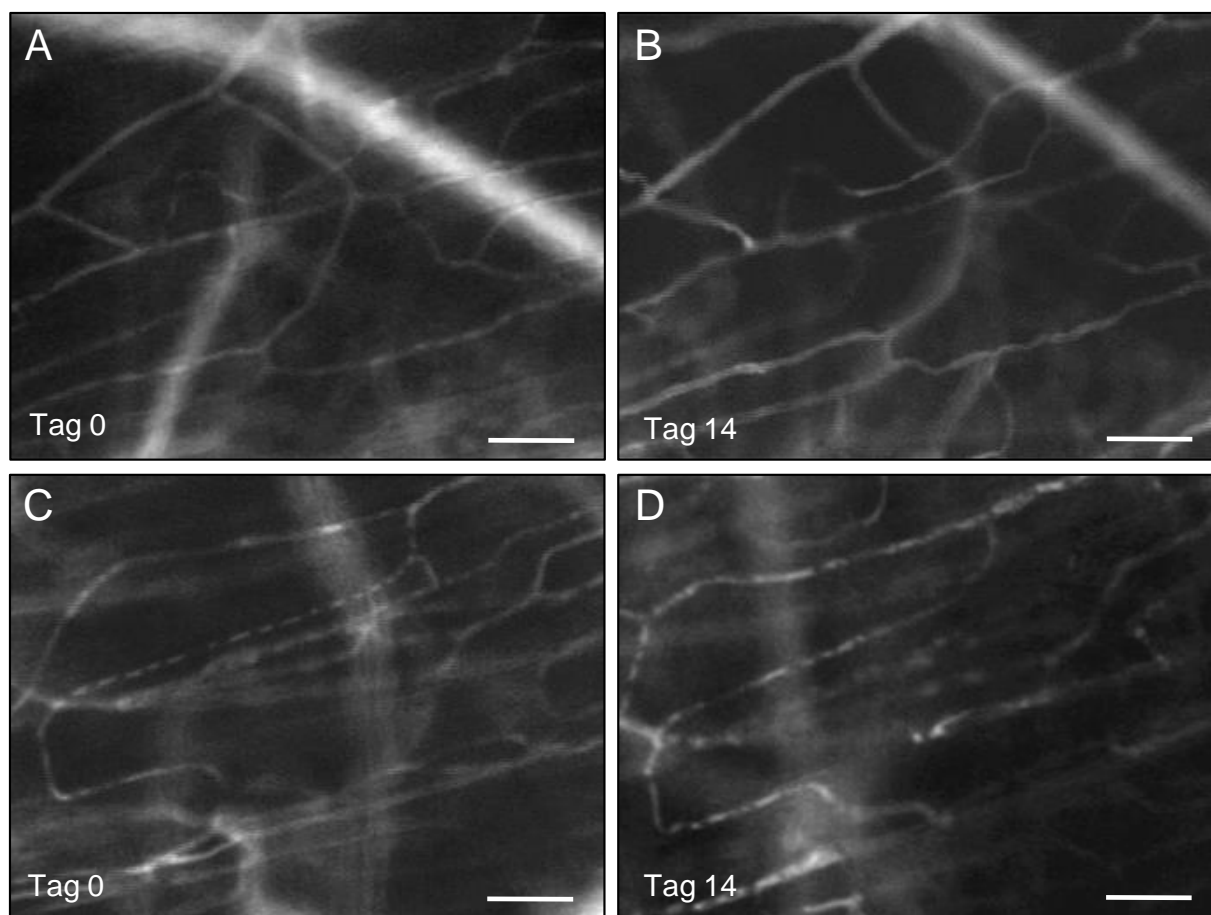


Abbildung 27: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung der Kapillaren des quergestreiften Muskels durch 5% FITC-markiertes Dextran 150,000 i.v., in biomaterialfreien Rückenhautkammern von BALB/c Mäusen direkt (A, C) sowie 14 Tage (B, D) nach topischer Applikation von HD MALP-2 (C, D) oder Vehikel (Kontrolle; A, B). Das Muster und die Dichte der Gefäße haben sich sowohl in der mit HD MALP-2-behandelten Gruppe als auch in der Kontrollgruppe über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum nicht verändert. A-D: Maßstab: 50µm.

6.3. Vaskularisierung von Medpor® nach Plasmabehandlung

6.3.1. Oberflächencharakterisierung von Medpor®

Die durch die Plasmabehandlung modifizierten Medpor®-Implantate wurden zunächst mittels REM analysiert (*Abbildung 28*). Die Analysen zeigten, dass sich die typische makroskopische Struktur des Medpors® durch die Plasmabehandlung nicht veränderte (*Abbildung 28A-C*). Sowohl die plasmabehandelten als auch die unbehandelten Kontrollproben wiesen eine poröse Architektur mit Porengrößen von 100-500µm auf.

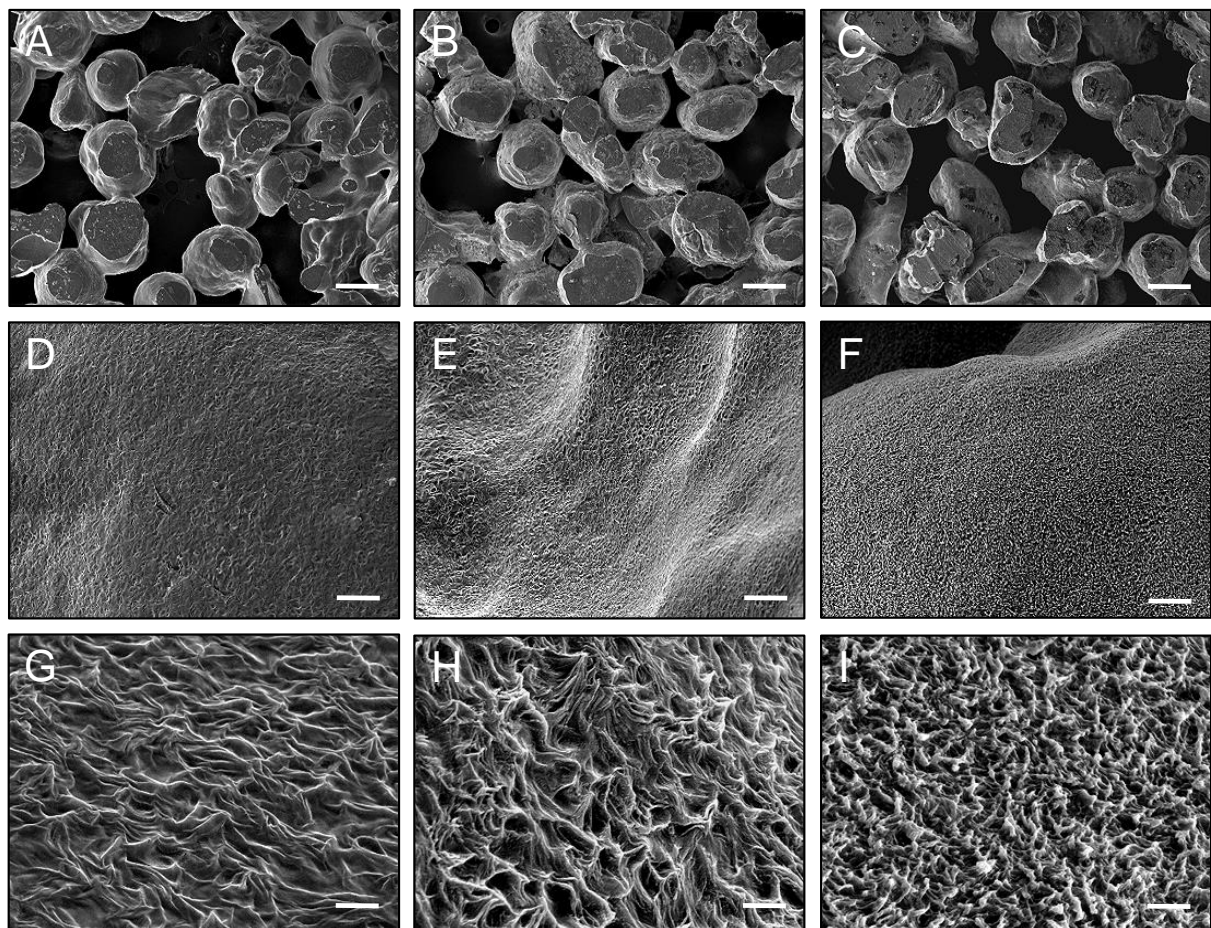


Abbildung 28: A-I: Repräsentative REM Bilder von unbehandeltem Medpor® (A, D, G), LE-PE (B, E, H) und HE-PE (C, F, I) in verschiedenen Vergrößerungen. Die Plasmabehandlung hat keinen Einfluss auf die makroskopische Struktur der Proben (Vergleiche A vs. B und C). Es zeigt sich eine erhöhte Mikro-Rauigkeit des Originalmaterials bei Plasmabehandlung mit niedrigem Energie Level (Vergleiche D vs. E, F). Bei Plasmabehandlung mit hoher Energie ändert sich die Nano-Rauigkeit der Oberfläche (Vergleiche G vs. H, I). Maßstab: A-C: 230µm; D-F: 7,8µm; G-I: 1,1µm.

Im Gegensatz dazu zeigten die Analysen der Oberflächentopographie in hoher Vergrößerung eine unterschiedliche Oberflächenrauigkeit der einzelnen Proben. So nahm die Oberflächenrauigkeit bei zunehmendem Energie Level der Plasmabehandlung zu. Interessanterweise erhöhte sich bei Plasmabehandlung mit niedrigem Energie Level die Mikro-Rauigkeit des Originalmaterials (*Abbildung 28 D-F*). Dagegen war bei Plasmabehandlung mit hoher Energie vor allem eine Änderung der Nano-Rauigkeit der Oberfläche zu erkennen (*Abbildung 28 G-I*).

Zusätzliche Analysen der chemischen Eigenschaften des Materials zeigten eine signifikant reduzierte Menge an Kohlenstoff (C) und eine erhöhte Menge Sauerstoff (O) auf der Oberfläche von frisch plasmabehandelten LE-PE und HE-PE Proben im Vergleich zu unbehandeltem Medpor® (*Tabelle 2*). Durch Untersuchungen zusätzlicher plasmabehandelter Proben, die bereits acht Monate vor Analyse hergestellt wurden, konnte gezeigt werden, dass diese chemischen Veränderungen der Materialoberfläche im Zeitverlauf wieder verloren gingen (*Tabelle 2*).

| | C (%) | O (%) |
|------------------|--------------|----------------|
| <i>0 Monate:</i> | | |
| LE-PE | 94,9 ± 0,3* | 235,0 ± 8,2* |
| HE-PE | 86,2 ± 0,8*# | 465,1 ± 20,3*# |
| <i>8 Monate:</i> | | |
| LE-PE | 97,8 ± 2,5 | 157,4 ± 65,5 |
| HE-PE | 95,1 ± 0,6 | 229,0 ± 16,9 |

Tabelle 2: Anteil von C und O (in % von unbehandeltem Medpor® (Kontrolle; n=3)) auf der Oberfläche von frisch hergestellten LE-PE and HE-PE Proben (0 Monate; n=3) oder Proben, die 8 Monate in einer 48-Well-Platte bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden (8 Monate; n=3). Mittelwert ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. LE-PE.

6.3.2. Vaskularisierung von implantiertem Medpor®

Das unbehandelte Medpor® der Kontrollgruppe induzierte eine frühe angiogene Reaktion im Empfängergewebe der Untersuchungstiere. Diese war durch die frühzeitige Ausbildung von Gefäßknospen und -sprossen, die aus Kapillaren und

postkapillaren Venolen im Bereich des Implantats und des umliegenden Gewebes stammten, charakterisiert. Im Laufe des Beobachtungszeitraums wuchsen die Gefäßknospen zunehmend in die Poren der Implantate ein. Die neu entstandenen Gefäße entwickelten sich schließlich zu einem dicht perfundierten Gefäßnetzwerk (*Abbildung 29A*).

Auch das Medpor® der mit Plasma-behandelten Untersuchungsgruppen induzierte eine angiogene Reaktion im Empfängergewebe. Allerdings war die Reaktion des Empfängergewebes in diesen beiden Gruppen weitaus schwächer ausgeprägt als in der unbehandelten Kontrollgruppe (*Abbildung 29B und C*).

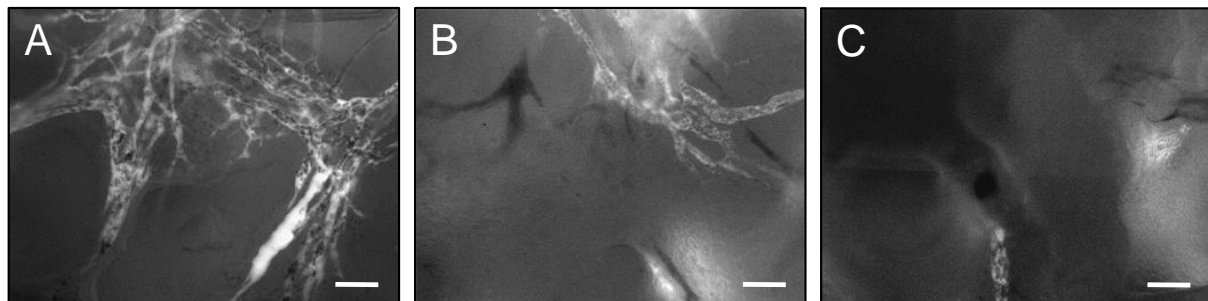


Abbildung 29: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit Blaulicht-Epi-Illumination zur Kontrastverstärkung durch 5% FITC-markiertes Dextran 150,000 i.v.. Es ist die Oberfläche von unbehandeltem Medpor® (A), LE-PE (B) und HE-PE (C) am 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen zu sehen. Die unbehandelte Kontrolle (A) zeigt eine verstärkte Vaskularisierung mit vielen perfundierten Blutgefäßen im Vergleich zu den Plasma-behandelten Proben (B, C). Maßstab: A-C: 70µm.

Zusätzlich zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der verwendeten Plasmaenergie und dem Ausmaß der Vaskularisierung der Proben. Die HE-PE Proben wiesen nach dem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen eine geringere Vaskularisierung im Vergleich zu den LE-PE Proben auf (*Abbildung 29B und C*).

6.3.2.1. Angiogenese-positive ROIs

In der Gruppe der HE-PE Proben war im Zeitverlauf die Zahl Angiogenese-positiver ROIs sowohl im Randbereich als auch im Zentrum der Implantate im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen deutlich reduziert (*Abbildung 30A und B*).

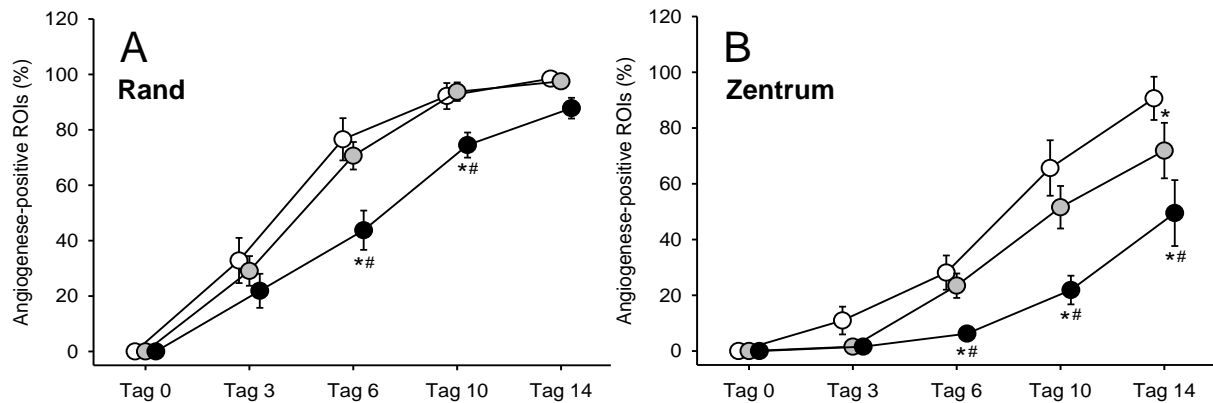


Abbildung 30: Angiogenese-positive ROIs (%) im Randbereich (A) und im Zentrum (B) von unbehandeltem Medpor® (Kontrolle; weiße Kreise, n=8), LE-PE (graue Kreise, n=8) und HE-PE (schwarze Kreise, n=8) direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; # $P < 0,05$ vs. LE-PE.

6.3.2.2. Funktionelle Kapillardichte

Zusätzlich zu den Angiogenese-positiven ROIs wurde die funktionelle Kapillardichte bestimmt (Abbildung 31). Diese wurde ebenfalls sowohl im Randbereich (Abbildung 31A) als auch im Zentrum (Abbildung 31B) der Implantate gemessen.

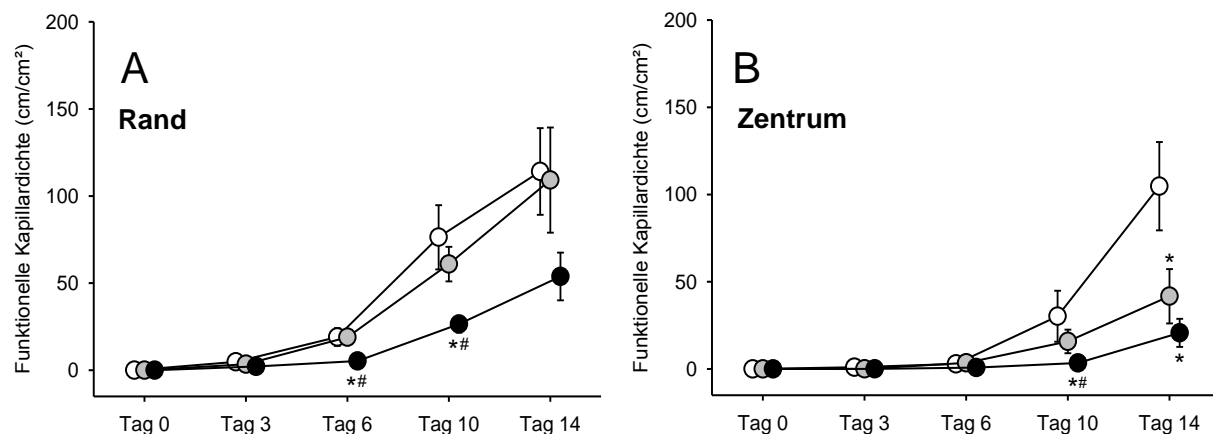


Abbildung 31: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) im Randbereich (A) und im Zentrum (B) von unbehandeltem Medpor® (Kontrolle; weiße Kreise, n=8), LE-PE (graue Kreise, n=8) und HE-PE (schwarze Kreise, n=8) direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; # $P < 0,05$ vs. LE-PE.

Die funktionelle Kapillardichte war in der HE-PE Gruppe zwischen dem 6. und 14. Tag im Randbereich und im Zentrum der Implantate im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen reduziert. In der LE-PE Gruppe war die funktionelle Kapillardichte

im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls reduziert, jedoch weitaus weniger stark. Somit konnte gezeigt werden, dass die Plasmabehandlung die Vaskularisierung der Implantate dosisabhängig inhibiert.

6.3.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In allen drei Gruppen wurde neben der Vaskularisierung auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Bereich der Implantationsstelle untersucht. So konnte die inflammatorische Reaktion im Empfängergewebe nach Implantation von unbehandeltem und Plasma-behandeltem Medpor® analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurden mehrere postkapillare Venolen und Sammelvenolen mit einem Durchmesser von 30-40µm im umliegenden Gewebe der Implantate randomisiert ausgewählt.

Durchmesser [µm]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|-------------|------------|------------|------------|--------------|
| Kontrolle | 33,8 ± 1,1 | 35,7 ± 0,8 | 35,1 ± 1,4 | 34,4 ± 1,1 | 36,4 ± 0,6 |
| LE-PE | 36,8 ± 0,6* | 33,7 ± 0,9 | 34,0 ± 0,8 | 33,5 ± 1,0 | 37,1 ± 0,7 |
| HE-PE | 33,6 ± 0,9# | 32,7 ± 1,2 | 32,5 ± 0,6 | 31,3 ± 0,4 | 33,8 ± 1,1*# |

Blutzellgeschwindigkeit [µm/s]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Kontrolle | 440,0 ± 43.3 | 334,6 ± 41.9 | 382,1 ± 63.4 | 342,6 ± 46,8 | 357,8 ± 47,9 |
| LE-PE | 282,0 ± 57.8 | 451,9 ± 36.0 | 429,6 ± 43.2 | 283,8 ± 30,3 | 346,1 ± 70,8 |
| HE-PE | 336,7 ± 37.5 | 355,5 ± 62.7 | 345,9 ± 47.0 | 279,4 ± 40,3 | 248,5 ± 36,3 |

Tabelle 3: Durchmesser (µm) und Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) der postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in der Umgebung des unbehandelten Medpors® (Kontrolle; n=8), LE-PE (n=8) und HE-PE (n=8) direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Mittelwerte ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle; #P<0,05 vs. LE-PE.

Im Laufe des zweiwöchigen Untersuchungszeitraums zeigten die wiederholten Analysen der mikrohämodynamischen Parameter dieser Gefäße keine relevanten Unterschiede bezüglich Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärem volumetrischem Blutfluss und Scherrate in allen drei Untersuchungsgruppen (*Tabellen 3 und 4*). Somit ist davon auszugehen, dass die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion unter vergleichbaren mikrohämodynamischen Bedingungen untersucht werden konnte.

Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss [pl/s]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Kontrolle | 246,3 ± 27,7 | 206,1 ± 26,1 | 236,7 ± 42,9 | 201,2 ± 26,4 | 233,7 ± 32,9 |
| LE-PE | 188,7 ± 39,1 | 253,3 ± 24,9 | 238,0 ± 16,8 | 158,3 ± 20,1 | 243,1 ± 60,0 |
| HE-PE | 188,2 ± 24,4 | 190,1 ± 41,4 | 180,6 ± 24,9 | 133,6 ± 17,8 | 143,7 ± 22,8 |

Scherrate [s^{-1}]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Kontrolle | 105,2 ± 10,8 | 75,9 ± 9,8 | 87,3 ± 14,7 | 80,0 ± 11,8 | 78,8 ± 10,7 |
| LE-PE | 61,3 ± 12,8* | 107,8 ± 8,9 | 102,7 ± 11,9 | 67,9 ± 7,3 | 73,5 ± 13,7 |
| HE-PE | 80,5 ± 9,2 | 87,2 ± 14,2 | 85,1 ± 11,7 | 71,7 ± 10,8 | 58,5 ± 8,7 |

Tabelle 4: Mikrovaskulärer volumetrischer Blutfluss (pl/s) und Scherrate (s^{-1}) in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in der Umgebung des unbehandelten Medpors® (Kontrolle; n=8), LE-PE (n=8) und HE-PE (n=8) direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Mittelwerte ± SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die physiologischen Werte für die Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten liegen in nicht entzündetem Gewebe gewöhnlich nicht höher als $\sim 10\text{-}20\text{min}^{-1}$ und $\sim 100\text{-}200\text{mm}^{-2}$ (RÜCKER et al., 2006; SCHUMANN et al., 2009). Im Gegensatz dazu liegen die Werte für rollende und adhärenente Leukozyten bei einer starken Entzündung bei $30\text{-}40\text{min}^{-1}$ und $600\text{-}700\text{mm}^{-2}$ (RÜCKER et al., 2006).

Im Vergleich zu diesen Werten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in allen drei Gruppen keine relevante leukozytäre Entzündungsreaktion festgestellt werden. Es waren in den drei Untersuchungsgruppen keine größeren Unterschiede im Fließverhalten der Leukozyten zu erkennen (*Tabelle 5*). Sowohl die Werte der

rollenden, als auch die der adhärenenten Leukozyten lagen im physiologischen Bereich.

Rollende Leukozyten [min^{-1}]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|----------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Kontrolle | 11,6 \pm 3,6 | 8,7 \pm 1,6 | 11,1 \pm 2,3 | 6,3 \pm 1,2 | 20,6 \pm 7,7 |
| LE-PE | 14,9 \pm 2,2 | 16,1 \pm 2,4* | 12,9 \pm 2,6 | 9,5 \pm 3,7 | 14,9 \pm 3,8 |
| HE-PE | 9,7 \pm 2,2 | 9,5 \pm 2,0 [#] | 14,1 \pm 1,1 | 11,0 \pm 1,3 | 10,2 \pm 2,6 |

Adhärenente Leukozyten [mm^{-2}]:

| | Tag 0 | Tag 3 | Tag 6 | Tag 10 | Tag 14 |
|-----------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Kontrolle | 126,8 \pm 22,2 | 95,2 \pm 18,4 | 119,8 \pm 26,3 | 127,6 \pm 17,4 | 144,4 \pm 33,7 |
| LE-PE | 247,4 \pm 26,5* | 146,1 \pm 20,3 | 152,1 \pm 48,1 | 94,8 \pm 24,4 | 108,1 \pm 23,3 |
| HE-PE | 206,4 \pm 19,9* | 139,7 \pm 20,7 | 184,1 \pm 25,7 | 158,1 \pm 18,4 | 120,5 \pm 17,3 |

Tabelle 5: Rollende Leukozyten (min^{-1}) und adhärenente Leukozyten (mm^{-2}) in den postkapillaren Venolen und Sammelvenolen in der Umgebung des unbehandelten Medpors® (Kontrolle; n=8), LE-PE (n=8) und HE-PE (n=8) direkt (Tag 0) sowie am 3., 6., 10. und 14. Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle; [#] $P < 0,05$ vs. LE-PE.

6.3.4. Histologie und Immunhistochemie

Im Anschluss an den 14-tägigen Untersuchungszeitraum wurden die Rückenhautkammerpräparationen für histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen. Die Analysen zeigten, dass sich um die unbehandelten Kontrollimplantate ein Granulationsgewebe mit einer hohen Zelldichte ausbildete (Abbildung 32A). Im Vergleich dazu waren die LE-PE Proben und vor allem die HE-PE Proben von weitaus weniger neugebildetem Granulationsgewebe umgeben (Abbildung 32B und C).

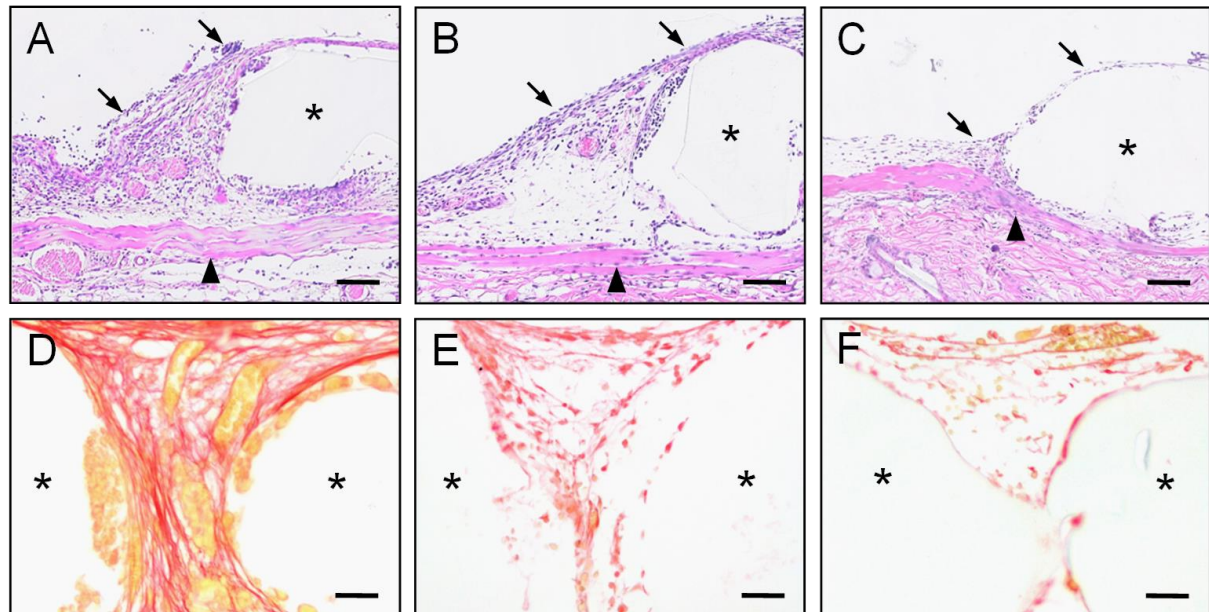


Abbildung 32: A-C: HE-gefärbte Schnitte von unbehandeltem Medpor® (A), LE-PE (B) und HE-PE (C) (Sternchen) am 14. Tag nach Implantation auf den quergestreiften Muskel (Pfeilspitzen) der Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen. Die mit Plasma-behandelten Implantate sind von weniger neugebildetem Granulationsgewebe umgeben (B, C, Pfeile) als die Kontrolle (A, Pfeile). Maßstab: A-C: 70µm. D-F: Sirius-Red-gefärbtes Granulationsgewebe in einer Pore von unbehandeltem Medpor® (D), LE-PE (E) and HE-PE (F) (Sternchen). Bei den Plasma-behandelten Proben (E, F) haben sich deutlich weniger Kollagenfasern als bei der Kontrollprobe ausgebildet (D). Maßstab: D-F: 33µm.

Zusätzlich wurden histologische Schnitte der drei Untersuchungsgruppen mit Sirius Red gefärbt. Dabei zeigte sich, dass sich im Granulationsgewebe der Plasma-behandelten Proben ein weniger dichtes Netzwerk aus Kollagenfasern im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgebildet hat (Abbildung 32D-F).

Weiterhin wurden die Blutgefäße im Granulationsgewebe mit dem Endothelzellmarker CD31 visualisiert (Abbildung 33A-C). In den Plasma-behandelten Gruppen war die Dichte CD31-positiver Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert (Abbildung 33D). Dies bestätigt die intravitalmikroskopischen Messungen der funktionellen Kapillardichte.

Zusammengefasst bestätigen diese histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse den deutlichen Einfluss der Plasmabehandlung auf die Vaskularisierung und Gewebeinkorporation der Medpor®-Implantate.

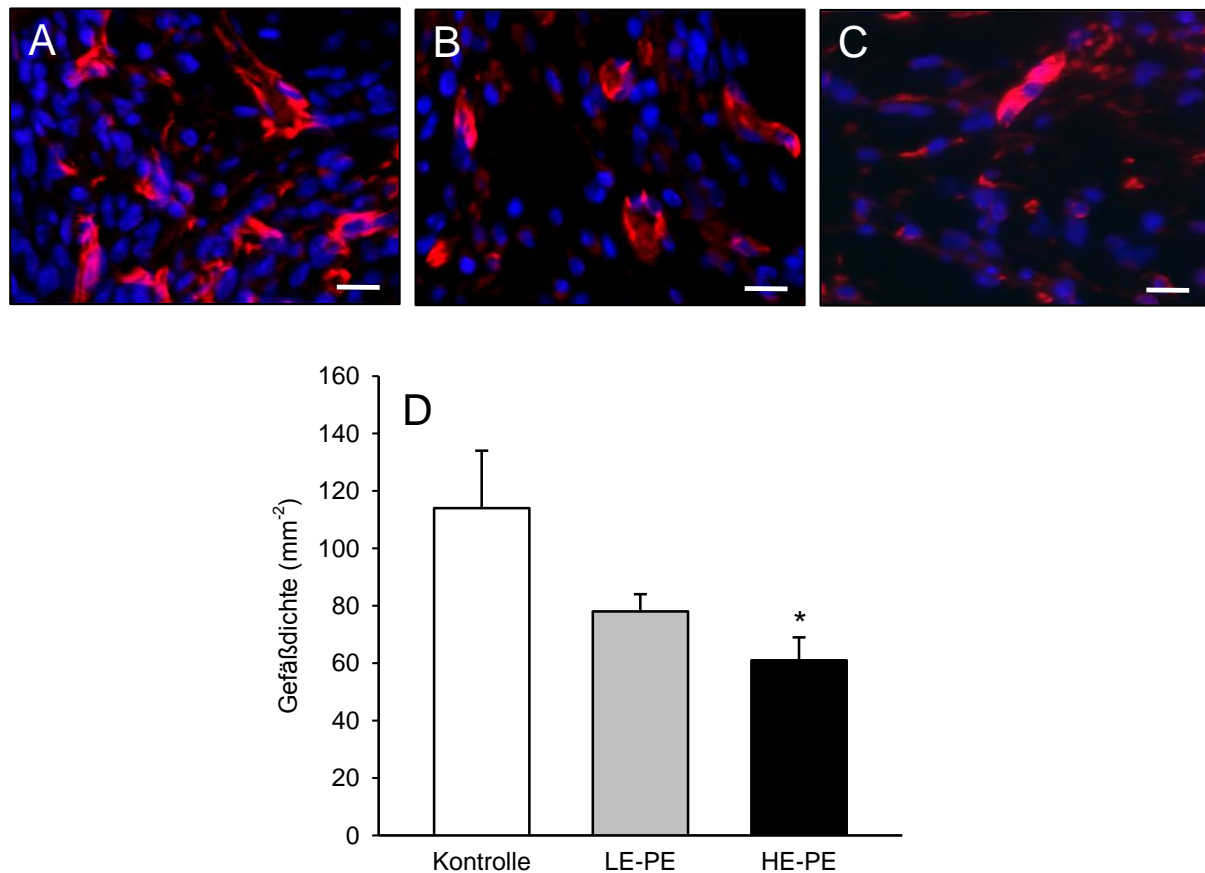


Abbildung 33: A-C: CD31-gefärbte Schnitte des Granulationsgewebes. Die unbehandelten Kontrollproben (A) zeigen im Vergleich zu den LE-PE (B) und HE-PE (C) Proben eine deutlich höhere Dichte an CD31-positiven Gefäßen (rot). Maßstab: A-C: 14µm. D: Gefäßdichte (mm⁻²) im Granulationsgewebe um unbehandeltes Medpor® (Kontrolle; weißer Balken, n=6), LE-PE (grauer Balken, n=6) und HE-PE (schwarzer Balken, n=6) am 14. Tag nach Implantation. Mittelwert ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrolle.

6.3.5. Zelladhäsion auf Medpor®

Zusätzlich zu den *in vivo* Untersuchungen wurden *in vitro* Experimente zur Zelladhäsion auf den Plasma-behandelten Proben durchgeführt. Dazu wurde mittels REM der Effekt der Plasmabehandlung auf die Oberflächenhaftung von HDMEC analysiert (Abbildung 34).

Hochauflösende REM Aufnahmen zeigten eine deutlich bessere Adhäsion der HDMEC auf unbehandeltem Medpor® (Abbildung 34A). Hier bildeten die Zellen zahlreiche Filopodien auf der Biomaterialoberfläche aus (Abbildung 34B).

Im Vergleich dazu war die Adhäsion der HDMEC auf den LE-PE Proben stark reduziert (Abbildung 34C und D). Noch deutlicher wurde der Effekt bei den Proben der HE-PE Gruppe, bei denen sich eine große Anzahl der Zellen komplett von der Oberfläche des Biomaterials ablöste (Abbildung 34E und F).

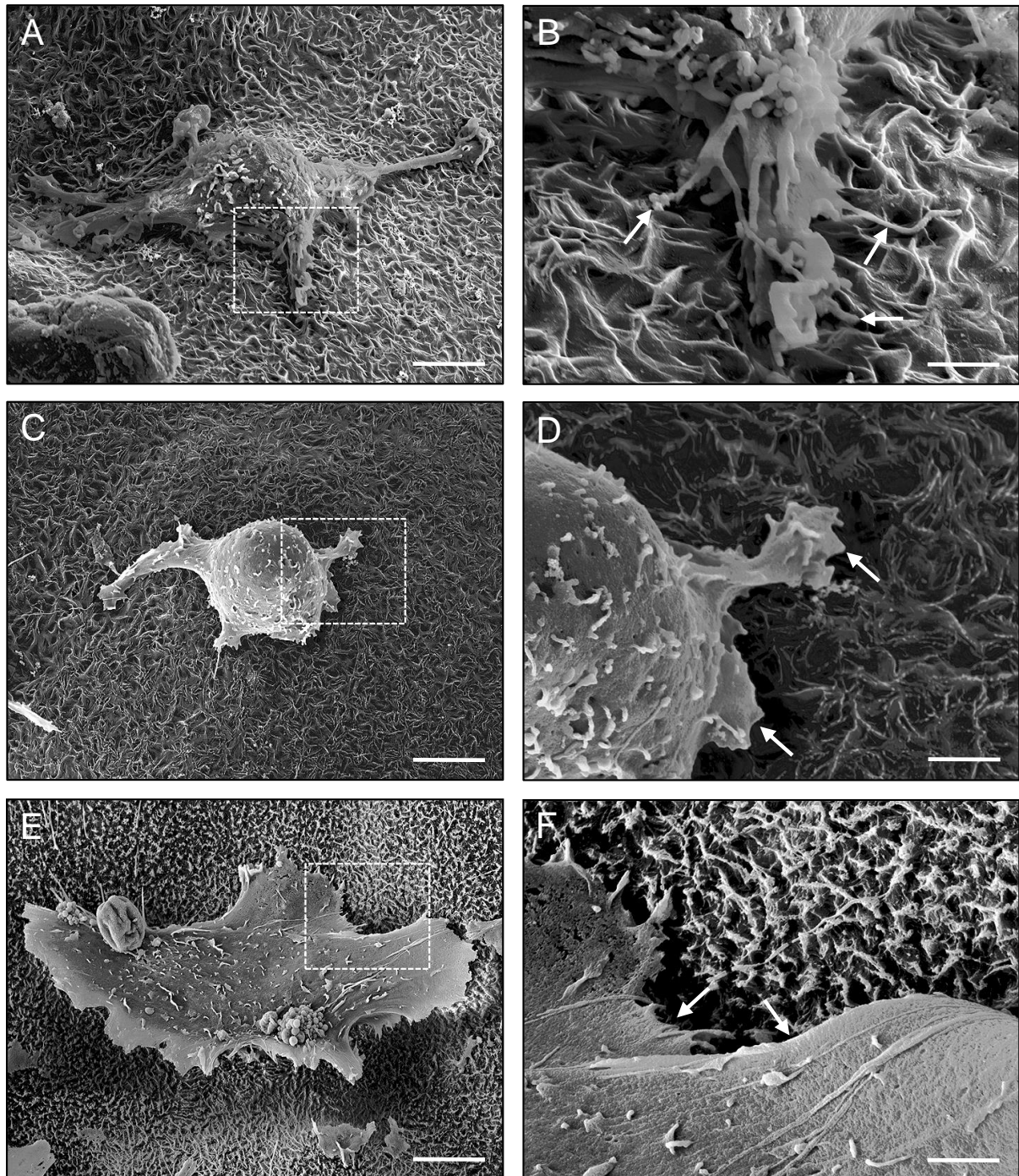


Abbildung 34: A-F: Repräsentative REM Bilder von HDMEC-besiedeltem, unbehandeltem Medpor® (A, B), LE-PE (C, D) und HE-PE (E, F). Die Plasmabehandlung beeinträchtigt die Adhäsion der Zellen auf der Materialoberfläche. In höherer Vergrößerung (B, D, F) weisen die Zellränder (A, C, E, gestrichelte Linie) viele Filopodien auf, die auf der rauen Oberfläche der Kontrollgruppe anhaften (B, Pfeile), während sich auf der Oberfläche von LE-PE (D, Pfeile) deutlich weniger Filopodien ausbilden und sich auf der Oberfläche von HE-PE die Zellen regelrecht ablösen (F, Pfeile). Maßstab: A, C, E: 6.5µm; B, D, F: 1.6µm.

6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® durch topische Applikation von MALP-2 und Plasmabehandlung beeinflussen lässt.

Im ersten Studienabschnitt konnte gezeigt werden, dass topisch appliziertes MALP-2 folgende Effekte auf die Vaskularisierung und Inkorporation des Biomaterials hat:

1. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Applikation von LD MALP-2 ist keine verstärkte Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel zu erkennen. Im Gegensatz dazu induziert die lokale Applikation von HD MALP-2 eine temporäre leukozytäre Entzündungsreaktion innerhalb der ersten 3 Tage nach Medpor®-Implantation.
2. Die lokale Applikation von MALP-2 verbessert die Vaskularisierung und Inkorporation der Implantate dosisabhängig. Die Medpor®-Implantate induzieren eine angiogene Reaktion im Empfängergewebe aller Gruppen. Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede in der Vaskularisierung der Implantate zwischen den Untersuchungsgruppen. Kapillardilatationen, Gefäßknospen und -sprossen sind in der HD MALP-2 Gruppe deutlich früher zu erkennen. Weiterhin bilden sich mikrovaskuläre Netzwerke um die Medpor®-Implantate in der HD MALP-2 Gruppe wesentlich schneller aus.
3. Die topische Applikation von MALP-2 im implantatfreien Empfängergewebe induziert keine angiogene Reaktion. Die Dichte an neugebildeten perfundierten Gefäßen ist ohne Biomaterial-Implantation sowohl nach MALP-2- als auch nach Vehikel-Applikation äußerst gering.

Im zweiten Studienabschnitt der Arbeit wurde der Effekt einer Sauerstoffplasmabehandlung auf die Vaskularisierung von Medpor® analysiert und folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. REM Untersuchungen zeigen keine Veränderung der typischen makroskopischen porösen Struktur des Medpors® durch Plasmabehandlung. In

detaillierteren Analysen der Oberflächentopographie ist allerdings eine Veränderung der Oberflächenrauigkeit des Materials abhängig vom Energie Level der Plasmabehandlung zu sehen. Die Mikro-Rauigkeit nimmt bei niedrigem und die Nano-Rauigkeit bei hohem Energie Level zu. Die Sauerstoff-plasmabehandlung verringert die Menge an Kohlenstoffmolekülen und erhöht die Menge an Sauerstoffmolekülen auf der Oberfläche von frisch behandelten Proben, verglichen mit unbehandeltem Medpor®. Diese chemischen Veränderungen der Materialoberfläche gehen im Zeitverlauf wieder verloren, die topographischen Veränderungen bleiben allerdings bestehen.

2. Das unbehandelte Medpor® der Kontrollgruppe induziert eine frühe angiogene Reaktion im Empfängergewebe mit frühzeitiger Bildung von Gefäßknospen und -sprossen. Im Verlauf entwickelt sich ein dichtes perfundiertes Gefäßnetzwerk. Die Reaktion des Empfängergewebes in den beiden plasmabehandelten Gruppen ist vergleichsweise verspätet und weitaus schwächer ausgeprägt. Zusätzlich zeigt sich ein Zusammenhang zwischen verwendeter Plasmaenergie und Ausmaß der Vaskularisierung. Die Implantate der HE-PE Gruppe weisen insgesamt eine reduzierte Vaskularisierung auf.
3. REM Aufnahmen zeigen eine deutlich bessere Haftung von Zellen auf unbehandeltem Medpor®. Viele Zellfortsätze bilden sich auf der Biomaterialoberfläche zur Zelladhäsion aus. Die Haftung der HDMEC Zellen auf den LE-PE Proben ist im Vergleich dazu deutlich reduziert. Dieser Effekt ist bei den mit hoher Energie behandelten Proben der HE-PE Gruppe noch stärker ausgeprägt. Bei diesen löst sich eine große Anzahl der Zellen von der Oberfläche des Biomaterials und diese bilden deutlich weniger Filopodien zur Adhäsion aus.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion von Material und Methodik

7.1.1. Diskussion des Modells

Die ersten tierexperimentellen Untersuchungen mit chronischen Beobachtungsfenstern wurden bereits zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts durchgeführt. 1924 beschrieb SANDISON ein solches Modell am Kaninchenohr, das 1943 von ALGIRE weiterentwickelt wurde. ALGIRE übertrug das Kaninchenohr-Modell von SANDISON auf die Maus, um am Mäuserücken Fett, Bindegewebe und den quergestreiften Unterhautmuskel (*M. panniculus carnosus*) mit auffallendem Licht im Zeitverlauf zu untersuchen. ENDRICH et al. führten 1980 erstmals die Präparation der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster ein. Hierzu wurde der *M. panniculus carnosus* präpariert, um anschließend mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Mikrozirkulation untersuchen zu können. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die gemessenen mikrohämodynamischen Daten mit denen aus früheren Modellen vergleichbar waren [BURTON UND JOHNSON, 1972; ENDRICH et al., 1980]. Bei den ersten Rückenhautkammer-Experimenten wurde allerdings vorwiegend Granulationsgewebe analysiert, das sich durch die Präparation der Kammern ausbildete. Auch heute wird zur Präparation die Rückenhautfalte von Mäusen, Ratten oder Hamstern verwendet [PAPENFUSS et al., 1979; LEHR et al., 1993; TORRES FILHO et al., 1995; ENDRICH et al., 1980]. Ein wesentlicher Vorteil der heutigen Methode ist jedoch, dass die Analyse der Mikrozirkulation nicht durch die Präparation der Kammer beeinflusst wird. So können objektive Untersuchungsbedingungen gewährleistet werden. Somit kann das Modell der Rückenhautkammer als eine etablierte Methode angesehen werden, um die Mikrozirkulation, Angiogenese, Inflammation und Ischämie-Reperfusion *in vivo* zu untersuchen [MENGER et al., 2002].

Die Vaskularisierung von Biomaterialien kann in verschiedenen experimentellen *in vivo* Modellen analysiert werden. Diese sollten die Möglichkeit bieten, die Mikrozirkulation nach Implantation der Biomaterialien im Zeitverlauf beurteilen zu können. Die Rückenhautkammer ist ein solches Modell, bei dem eine repetitive Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen durch Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich ist [LEHR et al.,

1993]. Auch ohne die Implantation von Biomaterialien lässt sich die Angiogenese in der Rückenhautkammer analysieren. So wurde in früheren Studien beispielsweise das Einwachsen neuer Blutgefäße in Tumorgewebe untersucht [ASAISHI et al., 1981; ENDRICH et al. 1982; REINHOLD UND ENDRICH, 1986].

Nach Präparation der Rückenhautkammer haben die Tiere in der Regel zwei Tage Zeit, um sich von dem chirurgischen Trauma zu erholen. So lassen sich Einflüsse der Präparation auf die Mikrozirkulation vermeiden [YAMAUCHI et al., 1999]. Der Untersuchungszeitraum erstreckt sich in der Regel über zwei bis drei Wochen. Die Maus wird als Untersuchungstier für die Rückenhautkammer häufig verwendet. Das Gewicht der Kammern, die aus zwei symmetrischen Titanrahmen bestehen, ist so gering, dass es auch für diese Tiere problemlos möglich ist, die Kammern über den zweiwöchigen Untersuchungszeitraum auf dem Rücken zu tragen.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde das Modell der Rückenhautkammer bereits in verschiedenen Studien verwendet, um die frühe inflammatorische und angiogene Gewebereaktion auf implantierte Biomaterialien zu untersuchen. Zu diesen zählen beispielsweise chirurgische Netze, Knochenersatzmaterialien und Scaffolds für das Tissue Engineering sowie Medpor® [LASCHKE et al., 2011; EHREMANTRAUT et al., 2010; EHREMANTRAUT et al., 2012]. Besonders gut eignet sich das Modell der Rückenhautkammer für die Implantation von Biomaterialien und für Transplantationsversuche, da es die Möglichkeit bietet, das Untersuchungsfenster temporär nach Präparation wieder zu öffnen [JEANMONOD et al., 2014; LASCHKE et al., 2015].

Bei der Analyse von Biomaterialien sollten die Implantate eine Größe von 3 x 3 x 1mm nicht überschreiten, da der Durchmesser des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer bei circa 10mm liegt. Die in die Rückenhautkammer implantierten Biomaterialproben sind deshalb in der Regel kleiner als in der klinischen Praxis. Dies ist jedoch üblicherweise kein Nachteil, sondern bietet den Vorteil, dass die Vaskularisierung unterschiedlicher Materialien unter standardisierten Größenbedingungen untersucht werden kann.

Das Empfängergewebe der Rückenhautkammer besteht aus quergestreiftem Muskelgewebe, subkutanem Gewebe und Haut, was nicht immer dem Empfängergewebe bei klinischer Anwendung von Biomaterialien entspricht. Zur Untersuchung von Medpor®-Implantaten ist die Rückenhautkammer allerdings

geeignet, da der Gewebeaufbau der Rückenhaut dem menschlichem Gewebe im kraniofazialen Bereich, wo Medpor® am häufigsten Anwendung findet, durchaus entspricht.

7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

Mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie können mikrozirkulatorische Analysen an Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen sowie Sammelvenolen durchgeführt werden. Sie bietet die Möglichkeit die Mikrozirkulation verschiedener Organe wie Darm, Leber, Pankreas, Herz, Lunge, Gehirn und auch Gewebe wie Muskel und Knochen zu untersuchen [WAHL et al., 1985; WINET et al. 1989; MENDER et al., 1992b; LEHR et al., 1993; VOLLMAR et al., 1995; MENDER et al., 1996; KUEBLER et al., 1997; VOLLMAR et al., 1998]. Mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie können vor allem dynamische Prozesse, wie die Vaskularisierung von Medpor®, optimal analysiert werden, da die Vaskularisierung im Zeitverlauf *in vivo* visualisiert werden kann [LEUNIG et al., 1992; MENDER et al., 1994; VAJKOCZY et al., 2000].

Die Mikrosphären-Technik [ZWISSLER et al., 1991], die Xenon-Clearance-Technik [HENDEL et al., 1983], die Thermographie [SAUMET et al., 1986] oder Farbstofftechniken [SILVERMAN et al., 1972] können die Mikrozirkulation nur indirekt visualisieren und wären für die durchgeführten Analysen deshalb weniger geeignet.

Weiterhin kann mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe das Fließverhalten von Leukozyten und Thrombozyten ermittelt werden [MENDER et al., 1992b; HOFFMANN et al., 1999, 2000]. Somit können auch inflammatorische Prozesse analysiert werden. Außerdem ist es möglich, Gefäßpermeabilität [PRIES et al., 1988], Nekrose und Apoptose [HARRIS et al., 1997; WESTERMANN et al., 1999] zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Ausbildung neuer mikrovaskulärer Netzwerke im Bereich der implantierten Medpor®-Proben als auch die leukozytäre Entzündungsreaktion des Kammergewebes analysiert.

Bei repetitiven Analysen über einen Untersuchungszeitraum von zwei Wochen ist es wichtig, die einzelnen Untersuchungen so kurz wie möglich zu halten, um die wiederholten Narkosezeiten der Tiere zu minimieren. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen können auf Videoband oder DVD aufgenommen werden. So ist es möglich, die quantitative Analyse der Aufnahmen zu einem späteren Zeitpunkt und

ohne Belastung der Versuchstiere durchzuführen [INTAGLIETTA et al. 1970; PRIES, 1988; KLYSCZ et al., 1997].

Weiterhin sollten die Belichtungszeiten während der einzelnen Untersuchungen so kurz wie möglich gehalten werden, da es bei zu langer Belichtung zu phototoxischen Effekten auf das zu untersuchende Gewebe kommen kann. Phototoxische Effekte entstehen durch Überwärmung des Gewebes bei langen Belichtungszeiten oder indirekt durch Bildung freier Sauerstoffradikale [POVLISHOCK et al. 1983; PENNING und DUBBELMAN, 1994]. Dadurch kann es unter anderem zu Blutplättchenaktivierung und Thrombosen [ROSENBLUM, 1978; HERRMANN, 1983], zur Reduktion der funktionellen Kapillardichte [FRIESENECKER et al., 1994] oder zu einer erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [GAWLOWSKI et al., 1989; SAETZLER et al., 1997] kommen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die maximale Untersuchungszeit pro Mikroskopie unter 20 Minuten gehalten und die übliche Dosierung für Rhodamin-6G und FITC-Dextran verwendet, um diese negativen Effekte zu vermeiden [STEINBAUER et al., 2000].

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Vaskularisierung von Medpor® nach MALP-2 Applikation

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine lokale Einmalapplikation des TLR-2/6 Agonisten MALP-2 dosisabhängig die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® in den ersten 14 Tagen nach Implantation in die Rückenhautkammer verbessert (*Abbildung 35*).

Dieser frühe Beobachtungszeitraum ist auch unter klinischen Bedingungen von besonderer Bedeutung. So haben bereits frühere Studien gezeigt, dass es insbesondere dann zur Infektion von implantiertem Medpor® kommt, wenn die Poren des Materials noch nicht komplett mit vaskularisiertem Granulationsgewebe aufgefüllt sind [SCALFANI et al., 1997]. Folglich ist die schnelle Vaskularisierung des Materials eine wesentliche Voraussetzung, um frühe Implantatinfektionen zu vermeiden.

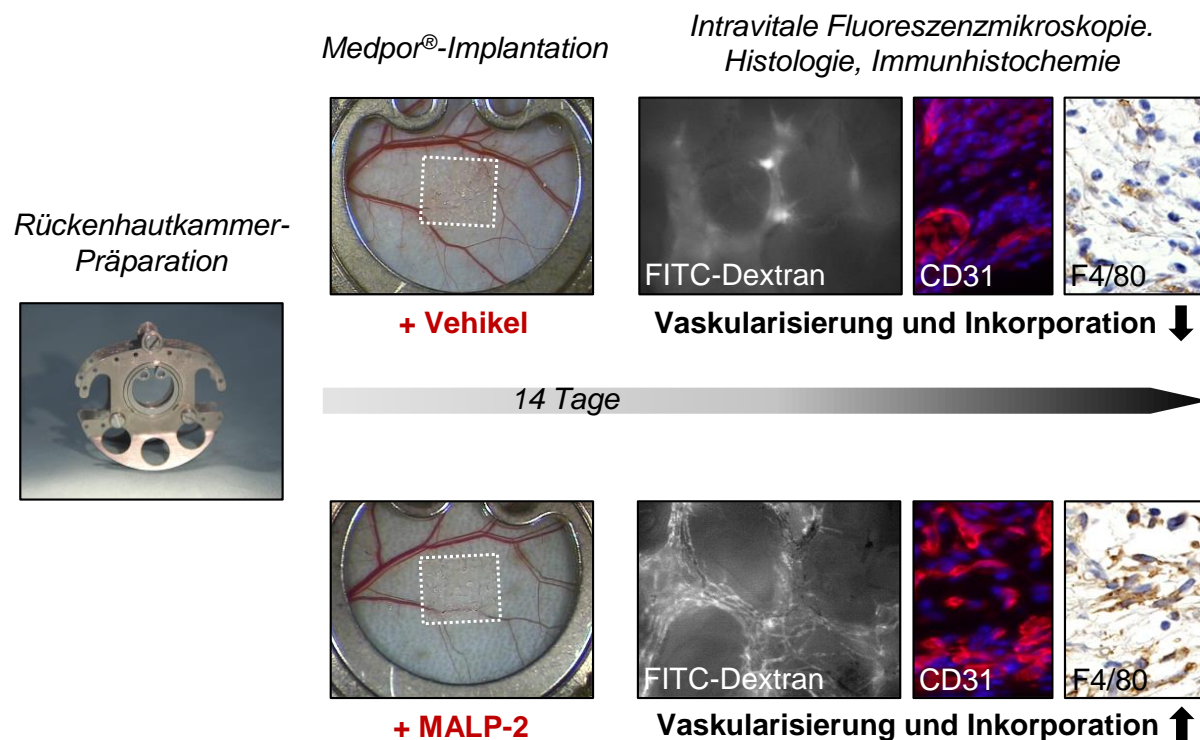


Abbildung 35: Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Studienabschnitts. Die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® in das Gewebe der Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen kann während des 14-tägigen Untersuchungszeitraums durch die lokale Applikation von MALP-2 wesentlich verbessert werden.

Weiterhin trägt eine schnelle Vaskularisierung zur stabilen Integration des Materials in das umliegende Gewebe bei und reduziert somit das Risiko der Freilegung des Materials und dessen Migration im Gewebe. Die schnelle Vaskularisierung der Implantate ist vor allem bei der rekonstruktiven Nasenchirurgie von Bedeutung, da es hier besonders schwierig ist, das Implantat mit vitalem Gewebe zu decken. Das Gewebe sollte dabei nicht zu dünn, vernarbt oder zu straff sein [STELTER et al., 2007].

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Strategien untersucht, welche die Vaskularisierung von Implantaten beschleunigen und verbessern sollen. Hierzu zählen beispielsweise strukturelle und chemische Modifikationen von Materialien. Weiterhin werden Implantate durch Beschichtung mit Wachstumsfaktoren biologisch aktiviert oder die Vaskularisierung durch eine Zellbesiedlung verbessert [STRIETH et al., 2010; EHRMANTRAUT et al., 2012; LASCHKE et al., 2006; JEANMONOD et al., 2013].

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode untersucht, bei der die Vaskularisierung von Medpor® durch Applikation von MALP-2 verbessert werden sollte. Um diese Methode in der klinischen Praxis anzuwenden, wären keine komplexen Materialmodifikationen notwendig. Auch die Operations-

dauer bei Implantation des Biomaterials würde sich nicht erheblich verlängern. Zudem wurde die lokale Applikation von MALP-2 bereits in klinischen Phase I und II Studien untersucht. Bei diesen konnten keine systemischen Nebenwirkungen während der Heilung kutaner Wunden nach MALP-2 Applikation festgestellt werden [NIEBUHR et al., 2008]. Weiterhin konnte das Überleben von Patienten mit irresektablen Pankreaskarzinomen durch MALP-2 Applikation verlängert werden [SCHMIDT et al., 2007]. Die topische Applikation von 1µg MALP-2 bei chronischen Wunden und 20µg MALP-2 bei Adenokarzinomen des Pankreas wurde gut toleriert. Auch die MALP-2-behandelten Mäuse der vorliegenden Arbeit zeigten keine relevanten systemischen Nebenwirkungen. Sie wiesen ein normales Fress-, Putz- und Schlafverhalten auf, das mit denjenigen der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe vergleichbar war.

MALP-2 kann die Vaskularisierung durch verschiedene Mechanismen stimulieren. GROTE et al. [2010] zeigten bereits, dass MALP-2 Endothelzellen zur Proliferation, Migration und Ausbildung tubulärer Strukturen unter *in vitro* Bedingungen fördert und die Sekretion des Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating Faktors (GM-CSF) stimuliert. Eine Inhibition von GM-CSF unterdrückt dagegen die MALP-2 induzierte Vaskularisierung *in vitro* und *in vivo*. Daraus kann man schließen, dass MALP-2 die Angiogenese GM-CSF-abhängig stimuliert.

Des Weiteren wurde in einer experimentellen Studie gezeigt, dass mit MALP-2 angereichertes Matrigel nach subkutaner Injektion in Mäuse schnell vaskularisiert. In dieser Studie war die Vaskularisierung des MALP-2-beladenen Matrigels genauso schnell wie die von VEGF-beladenen Kontrollen. Hierzu wurde Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel 1µg/ml MALP-2 zugegeben. Diese MALP-2 Dosis war nur geringfügig höher als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis der LD MALP-2 Gruppe (0,67 µg/ml). Diese Dosis führte jedoch nicht zu einer vermehrten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie verbesserten Vaskularisierung. Der Grund für die Diskrepanz dieser beiden Studien könnte darin liegen, dass Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel bereits ohne MALP-2 eine pro-angiogene Wirkung hat. Es enthält geringe Mengen an VEGF, insulin-like growth factor-1 und transforming growth factor-β [LASCHKE et al., 2008]. Entsprechend könnte die intrinsische pro-angiogene Aktivität des verwendeten Matrigels zu den beobachteten MALP-2-Effekten beigetragen haben. Die Ergebnisse von GROTE et al. [2010] zeigen dennoch eine direkte pro-angiogene Wirkung von MALP-2. In der vorliegenden Arbeit konnte

jedoch erstaunlicherweise keine Bildung neuer Blutgefäße in biomaterialfreien Rückenhautkammern, welche mit HD MALP-2 behandelt wurden, beobachtet werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass neben der MALP-2 Applikation möglicherweise ein weiterer Stimulus benötigt wird, um die Angiogenese in reizfreiem, nicht geschädigten Gewebe zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit war das implantierte Medpor® wahrscheinlich ein solcher Stimulus, der eine "Fremdkörperreaktion" auslöste.

Der Begriff "Fremdkörperreaktion" fasst einen komplexen, mehrstufigen Prozess zusammen, der durch die dynamische Interaktion eines Biomaterials mit dem umliegenden Gewebe charakterisiert ist [ANDERSON et al., 2008]. Der Prozess beginnt mit der Adsorption von Proteinen auf der Biomaterialoberfläche. Diese absorbierten Proteine induzieren die Infiltration von Leukozyten und Makrophagen in den Implantatbereich, wobei die Makrophagen teilweise zu Fremdkörperriesenzellen fusionieren. Diese inflammatorischen Zellen setzen dann verschiedene Zytokine und angiogene Wachstumsfaktoren frei, welche die Inkorporation des Biomaterials in das vaskularisierte Granulationsgewebe fördern. Somit weist eine typische "Fremdkörperreaktion" viele Ähnlichkeiten mit dem Prozess der Wundheilung auf, bei dem die Rekrutierung inflammatorischer Zellen auch einen wichtigen Reiz zur adäquaten Regeneration des Gewebes darstellt [GURTNER et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MALP-2 in der Rückenhautkammer dosisabhängig eine temporäre leukozytäre Entzündungsreaktion in der frühen Phase nach Medpor®-Implantation auslöst. Auch die Ergebnisse vorheriger Studien zeigen, dass die Wundheilung durch lokal appliziertes MALP-2 bei gleichzeitiger inflammatorischer Reaktion verbessert werden kann. So konnte DEITERS [2004] zeigen, dass mit MALP-2 behandelte Wunden bei übergewichtigen Mäusen mit Diabetes zwei Wochen schneller als bei Kontrolltieren verheilen. Die Wundheilung nach MALP-2 Behandlung ging mit einer erhöhten Anzahl an Monozyten, Leukozyten und Makrophagen einher.

Die durch MALP-2 induzierte immunologische Stimulation kann zusätzlich die Immunabwehr stärken und Bakterien beseitigen. So verbessert sich die Immunabwehr gegen Infektionen mit *S. pneumoniae* nach Stimulation des Immunsystems mit MALP-2. Dies führt zu einer höheren Überlebensrate bei Pneumokokken-Pneumonien [REPPE et al., 2009].

In der vorliegenden Studie wies das neugebildete Granulationsgewebe um die Implantate der mit HD MALP-2 behandelten Kammern eine erhöhte Zahl Makrophagen auf. MALP-2 fördert die Inkorporation des implantierten Medpors® durch eine makrophagenabhängige Ausbildung von vaskularisiertem Granulationsgewebe, das in die Poren des Biomaterials einwächst. Dies wiederum könnte das Anhaften von Bakterien auf der Implantatoberfläche verhindern und so unter klinischen Bedingungen das Risiko für frühe Implantatinfektionen reduzieren.

7.2.1.1. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven

Zusammenfassend wurde im ersten Abschnitt dieser Arbeit eine neue Strategie zur Verbesserung der frühen Vaskularisierung von Medpor® durch topische Applikation des TLR-2/6 Agonisten MALP-2 entwickelt (*Abbildung 35*). Die Applikation von MALP-2 ist eine leicht anwendbare Methode, die das Einwachsen neuer Blutgefäße in die Implantate ohne wesentliche systemische Nebenwirkungen verbessert. Somit stellt die intra-operative Stimulation des Empfängergewebes mit MALP-2 ein vielversprechendes Konzept zur Verbesserung der Inkorporation des Biomaterials bei klinischer Implantation dar. Abgesehen davon könnte dieses Konzept auch bei der Implantation anderer alloplastischer Biomaterialien nützlich sein, bei denen eine schnelle Vaskularisierung und Inkorporation in das Gewebe wichtige Voraussetzungen für optimale Langzeitergebnisse sind. Hierzu zählen beispielsweise Scaffolds für das Tissue Engineering, Gefäßprothesen oder chirurgische Netze.

7.2.2. Vaskularisierung von Medpor® nach Plasmabehandlung

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine Plasmabehandlung die Vaskularisierung von Medpor® nicht verbessert werden kann, sondern sich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen sogar verschlechtert (*Abbildung 36*).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die Oberflächenstruktur und -chemie von Biomaterialien zu modifizieren. Dabei wird das Ziel verfolgt, eine optimale Integration implantierter Biomaterialien in das umliegende Empfängergewebe zu gewährleisten [NISHIMOTO et al., 2008; SCHLICHT et

al., 2010; LUNA et al., 2011; SHAH et al., 2011]. Hierbei wird zunächst in der Regel die Interaktion einzelner Zellen mit den modifizierten Biomaterialien *in vitro* untersucht.

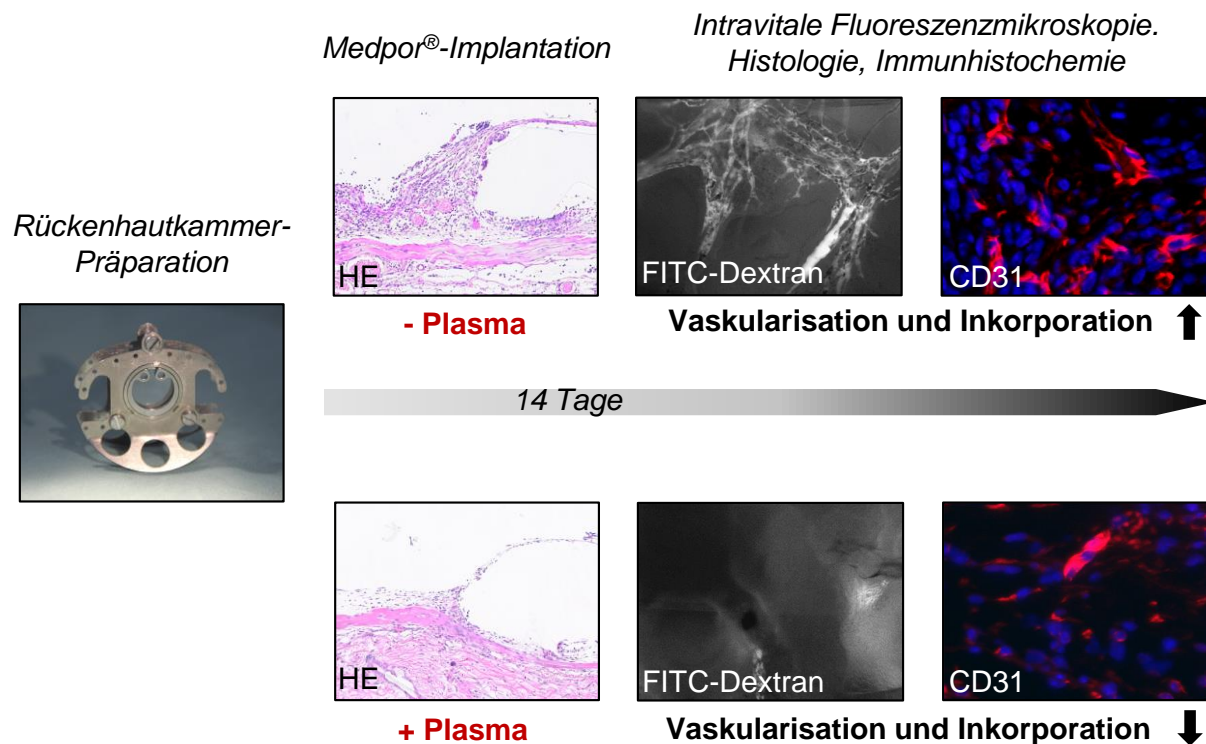


Abbildung 36: Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Studienabschnitts. Durch eine Sauerstoffplasmabehandlung wird die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® in das Gewebe der Rückenhautkammer von BALB/c Mäusen während des 14-tägigen Untersuchungszeitraums inhibiert.

Solche Untersuchungen der Zell-Biomaterial-Interaktion spiegeln jedoch nicht zwangsläufig die *in vivo* Reaktion des Empfängerorgans auf implantierte Biomaterialien wider [NOVAES et al., 2010]. Deshalb sollten die Auswirkungen von Oberflächenmodifizierungen grundsätzlich auch *in vivo* in einem geeigneten Tiermodell untersucht werden. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde nun zum ersten Mal der Effekt einer Sauerstoffplasmabehandlung auf die Vaskularisierung und Inkorporation von Medpor® am Modell der Rückenhautkammer analysiert.

Durch die Sauerstoffplasmabehandlung war es nicht nur möglich, die Oberflächentopographie, sondern auch die Oberflächenchemie des Biomaterials zu modifizieren. Eine Sauerstoffplasmabehandlung schafft typischerweise eine hydrophilere Polymeroberfläche. Dies ist durch die Plasma-induzierte Modifizierung der C-OH Gruppen bedingt. Allerdings ist diese chemische Modifikation nur von kurzer Zeitdauer, da es schnell zu Umwandlungs- und Oxidationsprozessen kommt,

wenn das behandelte Material an der Luft aufbewahrt wird, was zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen hydrophoben Oberfläche führt [ALVES et al., 2011]. Dementsprechend wiesen frisch behandelte LE-PE und HE-PE Proben eine signifikant reduzierte Menge an Kohlenstoff (C) und eine erhöhte Menge an Sauerstoff (O) im Vergleich zu unbehandeltem Medpor® an deren Oberfläche auf. Die Veränderungen der Oberflächenchemie waren allerdings nach einer Lagerung der Proben von acht Monaten weitaus geringer ausgeprägt. Daraus lässt sich schließen, dass die chemischen Oberflächenmodifikationen nur von kurzer Zeitdauer waren. Deshalb sollten die Proben nach der Plasmabehandlung zeitnah verwendet werden, um von den chemischen Modifikationen profitieren zu können.

REM Analysen zeigten, dass unbehandeltes Medpor® bereits eine raue, mikroskopisch sichtbare Oberflächenstruktur aufweist. Die Plasmabehandlung steigerte die Oberflächenrauigkeit des Biomaterials, ohne die poröse Architektur zu verändern. Im Vergleich zu den chemischen Modifikationen blieb die Plasma-induzierte Änderung der Oberflächenstruktur im Zeitverlauf bestehen.

Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen zeigten allerdings deutlich, dass die Plasmabehandlung von Medpor® die Vaskularisierung der Implantate verschlechterte. In den mit Plasma-behandelten Proben bildete sich weniger stabiles, kollagenreiches Granulationsgewebe als in den Proben der Kontrollgruppe aus.

Weiterhin wurden zusätzliche REM Untersuchungen durchgeführt, um die Zelladhäsion auf den Implantaten zu untersuchen. Dazu wurden HDMEC auf Plasma-behandeltes Medpor® gesiedelt. Auf der Oberfläche der Plasma-behandelten Proben zeigten die Zellen eine deutlich geringere Adhäsion als auf unbehandelten Kontrollproben. Dies könnte eine Erklärung für die reduzierte Ausbildung eines kollagenösen Granulationsgewebes *in vivo* sein.

In vorigen Studien wurde bereits beschrieben, dass eine nano-raue Biomaterialoberfläche zu einer Abnahme von Zellwachstum, Migration und Adhäsion führt [PENNISI et al., 2011; YILDIRIMER und SEIFALIAN, 2015]. In diesem Zusammenhang zeigte DALBY [2008], dass das COL5A1 Gen bei Kultivierung von Fibroblasten auf einer hexagonalen Nano-Oberfläche herunter reguliert wird. Dies führt zu einer gestörten Kollagenproduktion dieser Zellen. Andererseits konnte in *in vitro* Studien auch nachgewiesen werden, dass raue Oberflächen die zelluläre Aktivität und Anhaftung begünstigen können [ENDRES et al., 2008]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine erhöhte Oberflächenrauigkeit von Titan die Proliferation und

Differenzierung von Osteoblasten stimuliert [MARTIN et al., 1995]. Weiterhin fand PENNISI [2011], dass die Nanotopographie einer Platinoberfläche die Migration von Fibroblasten inhibiert. Dabei ist das Aktin-Zytoskelett der Fibroblasten beeinträchtigt, so dass diese weniger Zelladhäsionsstrukturen ausbilden können. Zudem kommt es zu einer geringeren Genexpression der an Migration beteiligten Gene. Diese diskrepanten Ergebnisse legen nahe, dass es sinnvoll ist, die Oberflächenrauigkeit je nach Biomaterial so zu variieren, dass optimale Voraussetzungen zur *in vivo* Anwendung geschaffen werden. KHAN et al. [2005] verbesserten beispielsweise die Adhäsion und Langlebigkeit von Nervenzellen auf einem Biomaterial, indem sie die Oberflächenrauigkeit einer Siliciumscheibe für diese Zellen optimierten.

Die Oberflächenrauigkeit und die sich daraus ergebende Topographie, die Benetzung der Oberfläche sowie die chemischen Eigenschaften des Materials beeinflussen weiterhin die zelluläre Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren [BARTH et al., 2013; DAMANIK et al., 2014; OLIVARES-NAVARETE et al., 2015]. Es konnte bereits im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Ausmaß der initialen inflammatorischen Reaktion im Empfängergewebe ein entscheidender Faktor für die adäquate Inkorporation von Medpor® ist. Die leukozytäre Entzündungsreaktion wurde jedoch im zweiten Studienabschnitt durch die Plasmabehandlung nicht beeinträchtigt. Somit ist davon auszugehen, dass entzündliche Prozesse keinen Einfluss auf die unterschiedliche Vaskularisierung und Inkorporation der behandelten und unbehandelten Medpor®-Proben hatten.

7.2.2.1. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven

Zusammengefasst wurde im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit gezeigt, dass eine Oberflächenmodifikation durch Sauerstoffplasma die frühe Vaskularisierung und Gewebeinkorporation von Medpor® inhibiert (*Abbildung 36*). Somit kann diese Modifikation für die klinische Anwendung nicht empfohlen werden. Andererseits bilden Polyethylene und vergleichbare Polymer-Materialien häufig die Grundlage für andere biomedizinische Produkte, wie zum Beispiel chirurgische Drainagen oder Kathetersysteme. Bei diesen wäre eine starke Gewebeinkorporation nicht wünschenswert, da die Materialien nur vorübergehend im Patienten verbleiben und anschließend wieder leicht entfernt werden sollen. Für solche Anwendungen könnten daher die hier beschriebenen Effekte einer Sauerstoffplasmabehandlung von Vorteil sein.

8. LITERATUR

1. **ALGIRE GH:** An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11, 1943
2. **ALVES P, PINTO S, DE SOUSA HC, GIL MH:** Surface modification of a thermoplastic polyurethane by low-pressure plasma treatment to improve hydrophilicity. *J Appl Polym Sci* 122: 2302-2308, 2011
3. **ANDERSON JM, RODRIGUEZ A, CHANG DT:** Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20: 86-100, 2008
4. **ASAISHI K, ENDRICH B, GÖTZ A, MESSMER K:** Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res* 41: 1898-1904, 1981
5. **BAKER M, WAYLAND H:** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143, 1974
6. **BARTH KA, WATERFIELD JD, BRUNETTE DM:** The effect of surface roughness on RAW 264.7 macrophage phenotype. *J Biomed Mater Res A* 101: 2679-2688, 2013
7. **BERGHAUS A:** Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch Otolaryngol* 111: 154-160, 1985
8. **BERGHAUS A, STELTER K:** Alloplastic materials in rhinoplasty. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14: 270-277, 2006
9. **BERGHAUS A, STELTER K, NAUMANN A, HEMPEL JM:** Ear reconstruction with porous polyethylene implants. *Adv Otorhinolaryngol* 68: 53-64, 2010
10. **BURTON KS, JOHNSON PC:** Reactive hyperemia in individual capillaries of skeletal muscle. *Am J Physiol* 223: 517-524, 1972

11. **BUSENLECHNER D, TANGL S, MAIR B, FUGGER G, GRUBER R, REDL H, WATZEK G:** Simultaneous *in vivo* comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials* 29: 3195-3200, 2008
12. **CHO JJ, TAYLOR RC, DEUTSCHMANN MW, CHANDARANA SP, MARCK PA:** Polyethylene implants in nasal septal restoration. *JAMA Facial Plast Surg* 15: 275-279, 2013
13. **DALBY MJ, GADEGAARD N, WILKINSON CD:** The response of fibroblasts to hexagonal nanotopography fabricated by electron beam lithography. *J Biomed Mater Res A* 84: 973-979, 2008
14. **DAMANIK FF, ROTHUIZEN TC, VAN BLITTERSWIJK C, ROTMANS JI, MORONI L:** Towards an in vitro model mimicking the foreign body response: tailoring the surface properties of biomaterials to modulate extracellular matrix. *Sci Rep* 4: 6325, 2014
15. **DEITERS U, GUMENSCHMEIER M, GALANOS C, MÜHLRADT PF:** Toll-like receptor 2- and 6-mediated stimulation by macrophage-activating lipopeptide 2 induces lipopolysaccharide (LPS) cross tolerance in mice, which results in protection from tumor necrosis factor alpha but in only partial protection from lethal LPS doses. *Infect Immun* 71: 4456-4462, 2003
16. **DEITERS U, BARSIG J, TAWIL B, MÜHLRADT PF:** The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Exp Dermatol* 13: 731-739, 2004
17. **DE VRIESE AS, VERBEUREN TJ, VALLEZ MO, LAMEIRE NH, DE BUYZERE M, VANHOUTTE PM:** Off-line analysis of red blood cell velocity in renal arterioles. *J Vasc Res* 37: 26-31, 2000
18. **EHRMANTRAUT S, LASCHKE MW, MERKEL D, SCHEUER C, WILLNECKER V, MEYER-LINDENBERG A, MENDER MD, NAUMANN A:** Perioperative steroid administration inhibits angiogenic host tissue response to porous polyethylene (Medpor) implants. *Eur Cell Mater* 19: 107-116, 2010

19. **EHRMANTRAUT S, NAUMANN A, WILLNECKER V, AKINYEMI S, KÖRBEL C, SCHEUER C, MEYER-LINDENBERG A, MENDER MD, LASCHKE MW:** Vitalization of porous polyethylene (Medpor®) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. *Tissue Eng A* 18: 1562-1572, 2012
20. **ENDRES S, WILKE M, KNÖLL P, FRANK H, KRATZ M, WILKE A:** Correlation of in vitro and in vivo results of vacuum plasma sprayed titanium implants with different surface topography. *J Mater Sci Mater Med* 19: 1117-1125, 2008
21. **ENDRICH B, ASAISHI K, GÖTZ A, MESSMER K:** Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 177: 125-134, 1980
22. **ENDRICH B, HAMMERSEN F, GÖTZ A, MESSMER K:** Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst.* 68: 475-485, 1982
23. **FRIESENECKER B, TSAI AG, INSTAGLIETTA M:** Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: H2204-2212, 1994
24. **FUNK W, ENDRICH B, MESSMER K:** A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med* 186: 259-270, 1986
25. **GAWLOWSKI DM, HARDING NR, GRANGER HJ:** Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 37: 1-15, 1989
26. **GROTE K, SCHÜTT H, SALGUERO G, GROTHUSEN C, JAGIELSKA J, DREXLER H, MÜHLRADT PF, SCHIEFFER B:** Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood* 115: 2543-2552, 2010
27. **GROTE K, PETRI M, LIU C, JEHN P, SPALTHOFF S, KOKEMÜLLER H, LUCHTEFELD M, TSCHERNIG T, KRETTEK C, HAASPER C, JAGODZINSKI M:** Toll-like receptor 2/6-dependent stimulation of mesenchymal stem cells promotes angiogenesis by paracrine factors. *Eur Cell Mater* 26: 66-79, 2013a

28. **GROTE K, SONNENSCHN K, KAPOPARA PR, HILLMER A, GROTHUSEN C, SALGUERO G, KOTLARZ D, SCHUETT H, BAVENDIEK U, SCHIEFFER B:** Toll-like receptor 2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 promotes reendothelialization and inhibits neointima formation after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2097-2104, 2013b
29. **GURTNER GC, WERNER S, BARRANDON Y, LONGAKER MT:** Wound repair and regeneration. *Nature* 15: 314-321, 2008
30. **HARRIS AG, STEINBAUER M, LEIDERER R, MESSMER K:** Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 273: 989-996, 1997
31. **HENDEL PM, LILIEN DL, BUNCKE HJ:** A study of the pharmacologic control of blood flow to acute skin flaps using xenon washout. Part I. *Plast Reconstr Surg* 71: 387-398, 1983
32. **HERRMANN KS:** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238-249, 1983
33. **HOFFMANN JN, VOLLMAR B, INTHORN D, SCHILDBERG FW, MENER MD:** A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock* 12: 355-364, 1999
34. **HOFFMANN JN, VOLLMAR B, INTHORN D, SCHILDBERG FW, MENER MD:** The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Shock* 14: 528-534, 2000
35. **HOFFMANN JN, VOLLMAR B, LASCHKE MW, INTHORN D, FERTMANN J, SCHILDBERG FW, MENER MD:** Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 32: 1011-1017, 2004
36. **INTAGLIETTA M, TOMPKINS WR, RICHARDSON DR:** Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc Res* 2: 462-473, 1970

37. **JEANMONOD P, LASCHKE MW, GOLA N, VON HEESSEN M, GLANEMANN M, DOLD S, MENDER MD, MOUSSAVIAN MR:** Silver acetate coating promotes early vascularization of Dacron vascular grafts without inducing host tissue inflammation. *J Vasc Surg* 58: 1637-1643, 2013
38. **JEANMONOD P, LASCHKE MW, GOLA N, VON HEESSEN M, GLANEMANN M, MENDER MD, MOUSSAVIAN MR:** Early host tissue response to different types of vascular prostheses coated with silver acetate or vaporized metallic silver. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 47: 680-688, 2014
39. **JUNG SK, CHO WK, PAIK JS, YANG SW:** Long-term surgical outcomes of porous polyethylene orbital implants: a review of 314 cases. *Br J Ophthalmol* 96: 494-498, 2012
40. **KHAN SP, AUNER GG, NEWAZ GM:** Influence of nanoscale surface roughness on neural cell attachment on silicon. *Nanomedicine* 1: 125-129, 2005
41. **KLYSCZ T, JÜNGER M, JUNG F, ZEINTL H:** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175, 1997
42. **KRAFT CN, HANSIS M, ARENS S, MENDER MD, VOLLMAR B:** Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 49: 192-199, 2000
43. **KUEBLER WM, KUHNLE GE, GROH J, GOETZ AE:** Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. *J Physiol* 501: 375-386, 1997
44. **LASCHKE MW, HARDER Y, AMON M, MARTIN I, FARHADI J, RING A, TORIO-PADRON N, SCHRAMM R, RÜCKER M, JUNKER D, HÄUFEL JM, CARVALHO C, HEBERER M, GERMANN G, VOLLMAR B, MENDER MD:** Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104, 2006
45. **LASCHKE MW, RÜCKER M, JENSEN G, CARVALHO C, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENDER MD:** Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 85: 397-407, 2008

46. **LASCHKE MW, HÄUFEL JM, SCHEUER C, MENDER MD:** Angiogenic and inflammatory host response to surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91: 497-507, 2009
47. **LASCHKE MW, VOLLMAR B, MENDER MD:** The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22: 147-164, 2011
48. **LASCHKE MW, KLEER S, SCHEUER C, SCHULER S, GARCIA P, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD:** Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24: 266-277, 2012
49. **LASCHKE MW, KLEER S, SCHEUER C, EGLIN D, ALINI M, MENDER MD:** Pre-cultivation of adipose tissue-derived microvascular fragments in porous scaffolds does not improve their in vivo vascularisation potential. *Eur Cell Mater* 29: 190-201, 2015
50. **LEHR HA, LEUNIG M, MENDER MD, NOLTE D, MESSMER K:** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1063, 1993
51. **LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA:** The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983, 1996
52. **LEUNIG M, YUAN F, MENDER MD, BOUCHER Y, GOETZ AE, MESSMER K, JAIN RK:** Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 52: 6553-6560, 1992
53. **LÜHRMANN A, TSCHERNIG T, PABST R, NIEWIESK S:** Improved intranasal immunization with live-attenuated measles virus after co-inoculation of the lipopeptide MALP-2. *Vaccine* 23: 4721-4726, 2005
54. **LUNA SM, SILVA SS, GOMES ME, MANO JF, REIS RL:** Cell adhesion and proliferation onto chitosan-based membranes treated by plasma surface modification. *J Biomater Appl* 26: 101-116, 2011

55. **MARTIN JY, SCHWARTZ Z, HUMMERT TW, SCHRAUB DM, SIMPSON J, LANKFORD J JR, DEAN DD, COCHRAN DL, BOYAN BD:** Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 29: 389-401, 1995
56. **MENGER MD, JAEGER S, WALTER P, FEIFEL G, HAMMERSEN F, MESSMER K:** Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 38: 199-201, 1989
57. **MENGER MD, JÄGER S, WALTER P, HAMMERSEN F, MESSMER K:** A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp* 9: 103-117, 1990a
58. **MENGER MD, HAMMERSEN F, WALTER P, MESSMER K:** Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 38: 139-145, 1990b
59. **MENGER MD, WOLF B, HÖBEL R, SCHORLEMMER HU, MESSMER K:** Microvascular phenomena during pancreatic islet graft rejection. *Langenbecks Arch Chir* 376: 214-221, 1991
60. **MENGER MD, HAMMERSEN F, MESSMER K:** In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 40: 19-25, 1992a
61. **MENGER MD, PELIKAN S, STEINER D, MESSMER K:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 263: H1901-H1906, 1992b
62. **MENGER MD, VAJKOCZY P, BEGER C, MESSMER K:** Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 93: 2280-2285, 1994
63. **MENGER MD, BONKHOFF H, VOLLMAR B:** Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 41: 823-830, 1996

64. **MENGER MD, LASCHKE MW, VOLLMAR B:** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91, 2002
65. **MOHAMMADI S, GHOURCHIAN S, IZADI F, DANESHI A, AHMADI A:** Porous high-density polyethylene in facial reconstruction and revision rhinoplasty: a prospective cohort study. *Head Face Med* 8: 17, 2012
66. **MÜHLRADT PF, KIESS M, MEYER J, SÜSSMUTH R, JUNG G:** Isolation, structure elucidation, and synthesis of macrophage stimulatory lipopeptiden from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185: 1951-1958, 1997
67. **NAIK MN, MURTHY RK, HONAVAR SG:** Comparison of vascularization of Medpor and Medpor-Plus orbital implants: a prospective, randomized study. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 23: 463-467, 2007
68. **NAUMANN A, EHRLMANTRAUT S, WILLNECKER V, MENGER MD, SCHICK B, LASCHKE MW:** Ear reconstruction using porous polyethylene implants. Effect of cortisone on edema reduction and healing process. *HNO* 59: 268-273, 2011
69. **NIEBUHR M, MÜHLRADT PF, WITTMANN M, KAPP A, WERFEL T:** Intracutaneous injection of macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) which accelerates wound healing in mice-a phase I trial in 12 patients. *Exp Dermatol* 17: 1052-1056, 2008
70. **NIECHAJEV I:** Facial reconstruction using porous high-density polyethylene (medpor): long-term results. *Aesthetic Plast Surg* 36: 917-927, 2012
71. **NISHIMOTO SK, NISHIMOTO M, PARK SW, LEE KM, KIM HS, KOH JT, ONG JL, LIU Y, YANG Y.** The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23: 675-680, 2008
72. **NOVAES AB JR, DE SOUZA SL, DE BARROS RR, PEREIRA KK, IEZZI G, PIATTELLI A:** Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J* 21: 471-481, 2010

73. **OLIVARES-NAVARRETE R, HYZY SL, SLOSAR PJ, SCHNEIDER JM, SCHWARTZ Z, BOYAN BD:** Implant materials generate different peri-implant inflammatory factors: PEEK promotes fibrosis and micro-textured titanium promotes osteogenic factors. *Spine (Phila Pa 1976)* 40: 399-404, 2015
74. **PAPENFUSS HD, GROSS JF, INTAGLIETTA M, TREESE FA:** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318, 1979
75. **PENNING LC, DUBBELMAN TM:** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 5: 139-146, 1994
76. **PENNISI CP, DOLATSHAHI-PIROUZ A, FOSS M, CHEVALLIER J, FINK T, ZACHAR V, BESENBACHER F, YOSHIDA K:** Nanoscale topography reduces fibroblast growth, focal adhesion size and migration-related gene expression on platinum surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 85: 189-197, 2011
77. **POVLISHOCK JT, ROSENBLUM WI, SHOLLEY MM, WEI EP:** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 110: 148-160, 1983
78. **PRIES AR:** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 327-345, 1988
79. **REINHOLD HS, ENDRICH B:** Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2: 111-137, 1986
80. **REINISCH JF, LEWIN S:** Ear reconstruction using a porous polyethylene framework and temporoparietal fascia flap. *Facial Plast Surg* 25: 181-189, 2009
81. **REPPE K, TSCHERNIG T, LÜHRMANN A, VAN LAAK V, GROTE K, ZEMLIN MV, GUTBIER B, MÜLLER HC, KURSAR M, SCHÜTTE H, ROSSEAU S, PABST R, SUTTORP N, WITZENRATH M:** Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 474-481, 2009
82. **RHARBAOUI F, DRABNER B, BORSUTZKY S, WINCKLER U, MORR M, ENSOLI B, MÜHLRADT PF, GUZMÁN CA:** The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol* 32: 2857-2865, 2002

83. **RHODES NP, WILSON DJ, WILLIAMS R:** The effect of gas plasma modification on platelet and contact phase activation processes. *Biomaterials* 28: 4561-4570, 2007
84. **RING A, TILKORN DJ, GOERTZ O, LANGER S, SCHAFFRAN A, AWAKOWICZ P, HAUSER J:** Surface modification by glow discharge gasplasma treatment improves vascularization of allogenic bone implants. *J Orthop Res* 29: 1237-1244, 2011
85. **ROLL S, MÜLLER-NORDHORN J, KEIL T, SCHOLZ H, EIDT D, GREINER W, WILICH SN:** Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery – systematic review and meta-analysis. *BMC Surg* 8: 22, 2008
86. **ROSENBLUM WI:** Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res* 15: 103-106, 1978
87. **RÜCKER M, LASCHKE MW, JUNKER D, CARVALHO C, SCHRAMM A, MÜLHAUPT R, GELLRICH NC, MENDER MD:** Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-5038, 2006
88. **RYAN G, PANDIT A, APATSIDIS DP:** Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* 27: 2651-2670, 2006
89. **SAETZLER RK, JALLO J, LEHR HA, PHILIPS CM, VASTHARE U, ARFORS KE, TUMA RF:** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513, 1997
90. **SANDISON JC:** The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat* 41: 447-472, 1928
91. **SAUMET JL, DITTMAR A, LEFTHERIOTIS G:** Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp* 5: 73-83, 1986

92. **SCLAFANI AP, THOMAS JR, COX AJ, COOPER MH:** Clinical and histologic response of subcutaneous expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex) and porous high-density polyethylene (Medpor) implants to acute and early infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 328-336, 1997
93. **SCHLICHT H, HAUGEN HJ, SABETRASEKH R, WINTERMANTEL E:** Fibroblastic response and surface characterization of O(2)-plasma-treated thermoplastic polyetherurethane. *Biomed Mater* 5: 25002, 2010
94. **SCHMIDT J, WELSCH T, JÄGER D, MÜHLRADT PF, BÜCHLER MW, MÄRTEN A:** Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist 'macrophage-activating lipopeptide-2' in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Br J Cancer* 97: 598-604, 2007
95. **SCHNEIDER C, SCHMIDT T, ZISKE C, TIEMANN K, LEE KM, UHLINSKI V, BEHRENS P, SAUERBRUCH T, SCHMIDT-WOLF IG, MÜHLRADT PF, SCHMIDT J, MÄRTEN A:** Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut* 53: 355-361, 2004
96. **SCHUMANN P, TAVASSOL F, LINDHORST D, STUEHMER C, BORMANN KH, KAMPMANN A, MÜLHAUPT R, LASCHKE MW, MENDER MD, GELLRICH NC, RÜCKER M:** Consequences of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo. *Microvasc Res* 78: 180-190, 2009
97. **SHAH A, SHAH S, MANI G, WENKE J, AGRAWAL M:** Endothelial cell behaviour on gas-plasma-treated PLA surfaces: the roles of surface chemistry and roughness. *J Tissue Eng Regen Med* 5: 301-312, 2011
98. **SHANKARAN V, WEBER DJ, REED RL 2ND, LUCHETTE FA:** A review of available prosthetics for ventral hernia repair. *Ann Surg* 253: 16-26, 2011
99. **SILVERMAN NR, INTAGLIETTA M, SIMON AL, TOMPKINS WR:** Determination of pulmonary pulsatile perfusion by fluoroscopic videodensitometry. *J Appl Physiol* 33: 147-149, 1972

100. **STEINBAUER M, HARRIS AG, ABELS C, MESSMER K:** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298, 2000
101. **STELTER K, STRIETH S, BERGHAUS A:** Porous Polyethylene Implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology* 45: 325-331, 2007
102. **STRIETH S, WEGER T, BARTESCH C, BITTMANN P, STELTER K, BERGHAUS A:** Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF. *J Biomed Mater Res A* 93: 1566-1573, 2010
103. **STRIETH S:** Tissue engineering using porous polyethylene implants. *HNO* 61: 211-216, 2013
104. **SVIRSKIS D, TRAVAS-SEJDIC J, RODGERS A, GARG S:** Electrochemically controlled drug delivery based on intrinsically conducting polymers. *J Control Release* 146: 6-17, 2010
105. **TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S:** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376, 2001
106. **TORRES FILHO IP, HARTLEY-ASP B, BORGSTRÖM P:** Quantitative angiogenesis in a syngeneic tumor spheroid model. *Microvasc Res* 49: 212-226, 1995
107. **VAJKOCZY P, SCHILLING L, ULLRICH A, SCHMIEDEK P, MENDER MD:** Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 510-520, 1998
108. **VAJKOCZY P, ULLRICH A, MENDER MD:** Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2: 53-61, 2000
109. **VENDEMIA N, CHAO J, IVANIDZE J, SANELLI P, SPINELLI HM:** A method for visualizing high density porous polyethylene (medpor, porex) with computed tomographic scanning. *J Craniofac Surg* 22: 73-76, 2011

110. **VOLLMAR B, CONZEN P, HABAZETTL H, ADILI F, PETER K:** Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg* 80: 249-255, 1995
111. **VOLLMAR B, BURKHARDT M, MINOR T, KLAUKE H, MENDER MD:** A correlation of intravital microscopically assessed NADH fluorescence, tissue oxygenation, and organ function during shock and resuscitation of the rat liver. *Adv Exp Med Biol* 454: 95-101, 1998
112. **WAHL M, UNTERBERG A, BAETHMANN A:** Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int J Microcirc Clin Exp* 4: 3-18, 1985
113. **WESTERMANN S, VOLLMAR B, THORLACIUS H, MENDER MD:** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126: 881-889, 1999
114. **WINET H:** A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 37: 105-114, 1989
115. **WINKLER AA, SOLER ZM, LEONG PL, MURPHY A, WANG TD, COOK TA:** Complications associated with alloplastic implants in rhinoplasty. *Arch Facial Plast Surg* 14: 437-441, 2012
116. **YAMAUCHI JI, VOLLMAR B, WOLF B, MENDER MD:** Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg* 16: 400-406, 1999
117. **YAREMCHUK MJ:** Facial skeletal reconstruction using porous polyethylen implants. *Plast Reconstr Surg* 111: 1818-1827, 2003
118. **YILDIRIMER L, SEIFALIAN AM:** Sterilization-Induced Changes in Surface Topography of Biodegradable POSS-PCLU and the Cellular Response of Human Dermal Fibroblasts. *Tissue Eng Part C Methods* 21: 614-630, 2015
119. **ZWISSLER B, SCHOSSER R, WEISS C, IBER V, WEISS M, SCHWICKERT C, SPENGLER P, MESSMER K:** Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med (Berl)* 191: 47-63, 1991

9. DANKSAGUNG

Auf diesem Wege möchte ich all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Menger und Herrn Prof. Dr. Matthias Laschke für die Überlassung des spannenden Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes arbeiten zu dürfen.

Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Matthias Laschke, der durch seine persönliche Anleitung, die stetige Unterstützung und konstruktive Kritik größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat. Sein Einsatz, die Begeisterung für sein Fach, der Perfektionismus und die vielen Ideen werden mir immer in bester Erinnerung bleiben und haben bei mir großes Interesse und Freude am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt.

Außerdem bedanke ich mich beim Team vom Leibniz Institut für neue Materialien in Saarbrücken für die gute Zusammenarbeit und die Herstellung der Plasma-behandelten Medpor®-Proben. Herrn Dr. Wolfgang Metzger danke ich für das Anfertigen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Scheuer, Julia Parakenings, Janine Becker und Sandra Schuler bedanken, die mir in sämtlichen technischen Fragen zur Seite standen. Ihre Unterstützung bei diversen Laborarbeiten und die Herstellung von histologischen Präparaten waren mir eine große Hilfe.

Insbesondere bedanke ich mich auch bei meiner großen Familie, die mich mit viel Interesse und Geduld jederzeit in allen Hinsichten unterstützt hat. Ich könnte mir keine bessere Familie wünschen.

10. PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

LASCHKE MW, **AUGUSTIN V**, KLEER S, TSCHERNIG T, MENDER MD: Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor®). *Acta Biomater* 10: 4661-4669, 2014

LASCHKE MW, **AUGUSTIN VA**, SAHIN F, ANSCHÜTZ D, METZGER W, SCHEUER C, BISCHOFF M, AKTAS C, MENDER MD: Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor®) implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* doi: 10.1002/jbm.b.33528, 2015

Zitierfähige Abstracts

AUGUSTIN V, KLEER S, TSCHERNIG T, MENDER MD, LASCHKE MW: Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor®). *Langenbecks Arch Surg* 399: 947, 2014

Vortrag auf den 18. Chirurgischen Forschungstagen 2014 in Hannover

AUGUSTIN VA, SAHIN F, ANSCHÜTZ D, METZGER W, SCHEUER C, BISCHOFF M, AKTAS C, MENDER MD LASCHKE MW: Surface modification by plasma etching impairs early vascularization and tissue incorporation of porous polyethylene (Medpor®) implants. *Eur Surg Res* 55: 266, 2015

Vortrag auf den 19. Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg